



## **FACOLTA' DI FARMACIA**

### **Corso di Laurea Specialistica in Farmacia**

“ Sviluppo di un modello sperimentale di cardio-tossicità da stress ossidativo su cardiomioblasti H9c2 e valutazione degli effetti cardio-protettivi di  $H_2S$  ”.

Relatori :

Dott. Vincenzo Calderone

Dott.ssa Alma Martelli

Candidato :

Valentina Grassini

Anno accademico 2013/2014

<b>1. Introduzione</b>	<b>3</b>
1.1 Gas trasmettitori	3
1.2 Stress ossidativo	7
1.3 Il solfuro di idrogeno ( $H_2S$ )	10
1.3.1 Proprietà chimiche e sintesi dell' $H_2S$	11
1.3.2 Catabolismo dell' $H_2S$	19
1.3.3 Meccanismo d'azione biologica dell' $H_2S$	22
1.4 I canali $K_{ATP}$	25
1.4.1 Regolazione dei canali al potassio $K_{ATP}$ sensibili	26
1.4.2 I canali sarc- $K_{ATP}$	28
1.4.3 I canali mito- $K_{ATP}$	30
1.4.4 Meccanismo di protezione esercitato dai canali mito- $K_{ATP}$	32
1.5 Attivatori e bloccanti dei canali $K_{ATP}$	34
1.5.1 Attivatori dei canali $K_{ATP}$	35
1.5.2 Bloccanti dei canali $K_{ATP}$	37
1.6 Struttura del canale $K_{ATP}$	39
 <b>2. Scopo della ricerca</b>	 <b>42</b>

<b>3. Materiali e Metodi</b>	<b>43</b>
3.1 Linea cellulare	43
3.2 Mezzi di coltura	44
3.3 Sostanze e Soluzioni usate	45
3.4 Metodiche sperimentali	46
3.5 Analisi dei dati	52
<b>4. Risultati e discussione</b>	<b>53</b>
<b>5. Bibliografia</b>	<b>64</b>

# 1. Introduzione

## 1.1 I gas trasmettitori

Negli ultimi anni lo studio dei ruoli patofisiologici e farmacologici dei “gas trasmettitori” ha rappresentato un interessante campo di ricerca, ancora oggi ampiamente inesplorato, che ha permesso di evidenziare la rilevanza biologica di tali mediatori in alcuni sistemi, con importanti implicazioni per la progettazione di nuovi farmaci (Moore et al. 2003, Olson and Donald 2009).

Un “gas trasmettitore” endogeno è caratterizzato :

- dalla capacità di diffondere attraverso le membrane biologiche
- da una autoregolazione della produzione endogena
- dalla capacità di modulare le vie metaboliche e le funzioni biologiche alla concentrazione fisiologica
- dalla presenza di specifici target biologici (Wang 2002)
- da una breve emivita
- da una potenziale tossicità se presente in eccesso (Kasperek et al. 2009)

L'ossido d'azoto (NO) è stato il primo “gas trasmettitore” ad essere stato identificato ed investigato sperimentalmente. La comprensione dei suoi molteplici ruoli nella modulazione fisiologica delle funzioni cardiovascolari, ha profondamente influenzato lo sviluppo della farmacologia cardiovascolare negli ultimi tre decenni.

Dopo l'NO, anche il monossido di carbonio (CO) ha suscitato interesse come modulatore gassoso biologico attivo.

Al momento sta emergendo un terzo candidato come soggetto di interesse scientifico: recenti scoperte indicano che il solfuro di idrogeno ( $H_2S$ ), un altro gas noto fino a pochi anni fa esclusivamente come un agente tossico, è in realtà un gas trasmettitore endogeno prodotto in quantità apprezzabili dai tessuti dei mammiferi, ove esercita una varietà di effetti fisiologici in differenti sistemi, fra i quali, in particolare, nel sistema cardiovascolare (Abe and Kimura 1996, Doeller et al. 2005, Szabo 2007).

A concentrazioni più alte di quelle fisiologiche, questi 3 “gas trasmettitori” sono potenzialmente dotati di attività tossica: alte concentrazioni di NO è noto che rappresentano una fonte di specie reattive, che possono produrre un danno principalmente al sistema cardiovascolare e al sistema nervoso (Ponderoso et al. 1996, Wei et al. 2000, Sarkela et al. 2001, Calabrese et al. 2007).

La grave tossicità del CO è ampiamente e marcatamente documentata: questo gas, se in eccesso, previene il legame dell'emoglobina con l'ossigeno, portando ad una rapida morte (Prockop and Chichkova 2007).

Anche alte concentrazioni di  $H_2S$  possono promuovere, potenzialmente, effetti letali attraverso una compromissione della respirazione

mitocondriale e possono essere coinvolte in altre condizioni patologiche, come l'infiammazione, la sepsi e l'infarto (Lowicka and Beltowski 2007).

Invece tutti e 3 i gas alle concentrazioni idonee giocano un ruolo fondamentale nella regolazione di numerose funzioni fisiologiche. Per esempio agiscono sulla muscolatura liscia gastrointestinale inibendo la contrazione (Kasperek 2007), agiscono sul sistema cardiovascolare causando una vasodilatazione, promuovendo l'angiogenesi ed esercitando un ruolo chiave nella cardioprotezione (Prockop and Chichkova 2007) ed infine sono coinvolti nella modulazione dei processi di sepsi, infatti si ritiene che esercitino effetti protettivi principalmente modulando i processi infiammatori (Baumgart et al. 2009).

Al momento, di questi tre gas endogeni, l'NO è stato senza dubbio il più ampiamente investigato e caratterizzato. Alcuni studi hanno chiarito i suoi molteplici ruoli fisiologici ed il meccanismo d'azione, ed alcune molecole capaci di rilasciare NO sono state proposte come nuovi strumenti farmacoterapeutici (Martelli et al. 2006, Martelli et al. 2009).

Al contrario, CO sembra avere modeste possibilità di sviluppo farmacologico a causa della sua alta tossicità e scarsa maneggevolezza. Riguardo all' $H_2S$  recenti studi indicano che questo "gas trasmettitore" potrebbe rappresentare un candidato efficace, nel campo dei modulatori gassosi endogeni, per lo sviluppo di farmaci che siano in grado di donare  $H_2S$  laddove i sistemi fisiologici che lo producono siano alterati.

Infatti  $H_2S$  possiede quasi tutti gli effetti benefici esibiti dall'NO sul sistema cardiovascolare e non mostra la deleteria produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) tipica dell'NO, ma agisce piuttosto da “scavenger” cioè da spazzino delle ROS (Whiteman et al. 2004, Whiteman et al. 2005).

Tabella 1

	NO	CO	$H_2S$
Via biosintetica	Dall'arginina tramite la NO sintasi	Dal catabolismo dell'eme a bilirubina ad opera dell'eme ossigenasi	4 vie enzimatiche e una non enzimatica
Sviluppo farmacologico	Esistono NO-donors e farmaci ibridi in grado di donare NO	Poche chances: troppo tossico e poco maneggevole	Esistono e/o sono in via di sviluppo $H_2S$ -donors e farmaci ibridi in grado di donare $H_2S$
Tossicità	Sviluppo di specie radicaliche (ROS) che mediano danni al SNC e a livello cardiovascolare	Impedisce il legame tra emoglobina ed ossigeno	Inibisce la respirazione mitocondriale (infiammazione, sepsi ed ictus)

**Tab 1.** In tabella 1 sono state riassunte le caratteristiche di biosintesi, tossicità e applicazione farmacoterapeutica dei tre principali gas-trasmettitori endogeni.

## 1.2 Stress ossidativo

Lo stress ossidativo si presenta come un meccanismo di danno cellulare determinato dalla presenza di un eccesso di specie radicaliche, prodotte a livello cellulare, prevalentemente in sede mitocondriale e caratterizzate da elevata reattività e instabilità chimica.

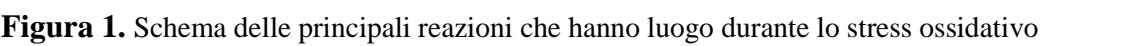
L'instabilità di tali specie radicaliche, anche dette specie reattive, solitamente, dell'ossigeno (ROS, Reactive oxygen species) o dell'azoto (RNS, Reactive nitrogen species) o di entrambi gli elementi (RONS, Reactive oxygen and nitrogen species), è dovuta alla presenza di un elettrone spaiato sull'orbitale più esterno con tendenza all'interazione con elettroni di altre molecole.

L'azione delle ROS si estrinseca principalmente su componenti cellulari quali lipidi, proteine, acidi nucleici, con conseguenti alterazioni strutturali cellulari.

Esse vengono normalmente prodotte a livello cellulare durante processi metabolici che richiedono ossigeno (figura 1), ma in condizioni fisiologiche la produzione delle ROS è controllata dai meccanismi omeostatici.

Quando il livello delle ROS eccede la capacità di neutralizzazione da parte dei sistemi antiossidanti, si verifica quella condizione denominata stress ossidativo, ovvero una condizione nella quale le difese antiossidanti dei tessuti sono superate dalla reattività delle specie radicaliche.



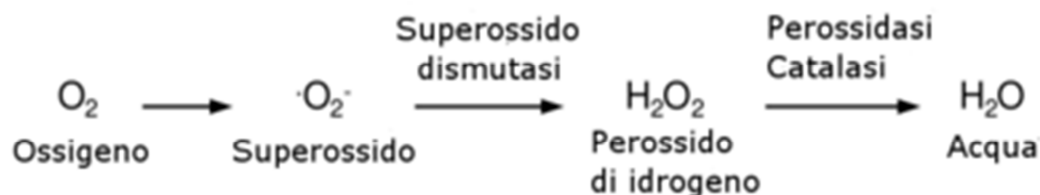


- l'anione superossido ( $\cdot O_2$ )<sup>-</sup>
- il radicale idrossilico ( $\cdot OH$ )
- il perossido d'idrogeno ( $H_2O_2$ )

- l'ossido d'azoto (NO) (Chen et al. 2012)

L'ossigeno serve come precursore nella formazione della maggior parte delle specie radicaliche.

La formazione delle suddette specie nel cuore è molto limitata in condizioni basali. Di norma è il risultato di una perdita di elettroni dalla catena di trasporto mitocondriale (ETC). In condizioni fisiologiche il cardiomiocita risponde alla formazione di bassi livelli di superossido ( $\cdot O_2^-$ ), inclusa la sua conversione nel meno citotossico  $H_2O_2$ , tramite l'azione dell'enzima superossido dismutasi (SOD) nel citoplasma o nel mitocondrio. L' $H_2O_2$  è successivamente convertito in acqua dalla catalasi o dal sistema della glutathione perossidasi (GPx) (figura 2).



**Figura 2.** La risposta del cardiomiocita alla formazione di bassi livelli di superossido ( $\cdot O_2^-$ )

Al contrario, durante determinate condizioni patologiche come l'ischemia/riperfusione (I/R), la formazione di ( $\cdot O_2^-$ ) è marcatamente aumentata e origina da multiple risorse cellulari.

Queste includono un danno alla catena di trasporto mitocondriale degli elettroni, alla NADPH ossidasi, alla NO sintetasi, alla xantina ossidasi, alla citocromo P450 monossigenasi e alla ciclossigenasi.

In più il sistema di difesa antiossidante si esaurisce durante l'I/R con l'alta attività delle specie radicaliche endogene e con l'inadeguata attività di enzimi come la SOD, la GPx e la catalasi .

La severità del danno ai cardiomiociti durante l'I/R varia dal reversibile al fatale, proporzionalmente all'entità delle reazioni delle RONS dentro le cellule (Raedschelders et al. 2012).

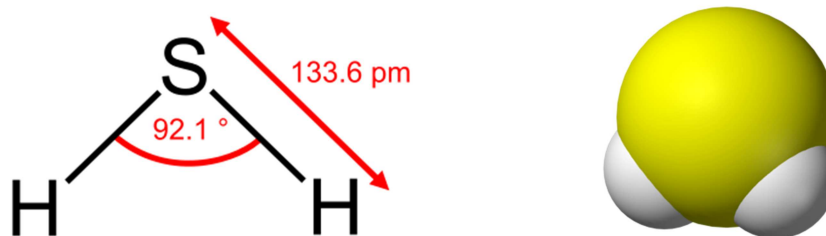
### 1.3 Il solfuro di idrogeno ( $H_2S$ )

Per molto tempo l' $H_2S$  è stato descritto solo come gas tossico che interferisce con la respirazione cellulare, ma questo suo ruolo attualmente è stato del tutto rivisto alla luce di tre recenti scoperte : 1) alcune linee di studio hanno dimostrato che l' $H_2S$  è generato da fonti endogene ed è fisiologicamente presente nel sangue e negli altri tessuti.

2) Gli enzimi generanti  $H_2S$  endogeno sono stati identificati nei tessuti dei mammiferi; infatti il solfuro di idrogeno è sintetizzato a partire dalla L-Cisteina, da due enzimi 2 piridossale 5' fosfato dipendenti: la Cistionina- $\beta$ -sintetasi (CBS) e la Cistationina- $\gamma$ -liasi (CSE). La CSE è risultata predominante a livello di tutto il sistema cardiovascolare.

3) È stato mostrato che l' $H_2S$  ha un ruolo fisiologico nella inibizione dell'adesione e dell'attivazione neutrofila (Kimura 2010, Szabo 2007, Wang 2003).

### 1.3.1 Proprietà chimiche e biosintesi dell' $H_2S$ :



**Figura 3.** Struttura molecolare dell' $H_2S$

In soluzione acquosa l' $H_2S$  (figura 3) è un acido debole e si dissocia in  $H^+$  e  $HS^-$  (anione idrosolfuro) che a sua volta può dissociarsi in  $H^+$  e anione solfuro ( $S^{2-}$ ) in accordo con la seguente reazione:



A pH e a temperatura fisiologici circa il 20% del solfuro totale esiste come acido indissociato e l'80% come anione  $HS^-$ , come teoricamente previsto dall'equazione di Henderson-Hasselbach (Dorman 2002, Dombkowski et al. 2004).

Così alle condizioni fisiologiche, percentuali significative di  $H_2S$  e  $HS^-$  coesistono ed entrambe le specie contribuiscono direttamente all'azione biologica dell' $H_2S$ .

Al contrario i livelli della specie ionica  $S^{2-}$  sono insignificanti poiché una dissociazione apprezzabile dell' $HS^-$  richiede un valore di pH più alto di quello fisiologico.

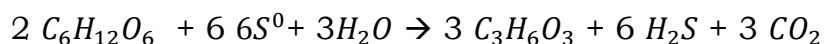
Grazie alla sua elevata lipofilità, l' $H_2S$  passa liberamente le membrane biologiche e penetra in tutti i tipi di cellule; questa proprietà conferisce all' $H_2S$  un alto potenziale biologico (Li and Moore 2008).

$HS^-$ , che è la specie prevalente, agisce come nucleofilo e si lega prontamente al centro metallico delle molecole biologiche, come ad esempio il sito di legame dell'ossigeno nell'emoglobina.

Questa caratteristica chimica, insieme ad altre caratteristiche metaboliche, potrebbe portare ad un sostanziale aumento della concentrazione di solfuro nel corpo (Hughes et al. 2009).

L' $H_2S$  endogeno può esser prodotto nei tessuti dei mammiferi da entrambe le vie, enzimatica e non enzimatica. La via non enzimatica, sebbene meno importante, procede attraverso la riduzione dello zolfo elementare a  $H_2S$  usando un equivalente di riduzione ottenuto dall'ossidazione del glucosio.

Il lattato è il principale prodotto del metabolismo del glucosio come riassunto nella seguente reazione:



Sebbene il glucosio supporti la produzione di  $H_2S$ , altri substrati sono altrettanto efficienti. Per esempio i trasportatori di elettroni NADH e NADPH sono coinvolti in questo processo: infatti il NADP, il NADPH ed il glutathione (GSH) stimolano la produzione di  $H_2S$  nei lisati cellulari degli eritrociti umani. Probabilmente il GSH è direttamente responsabile della maggior parte della produzione di  $H_2S$ . A sua volta il risultante glutathione ossidato (GSSG) è ridotto dal NAD(P)H e usato di nuovo (Wang 2002, Searcy and Lee 1998).

Riguardo al percorso enzimatico, la L-Cisteina è uno dei substrati usati per la produzione enzimatica di  $H_2S$  e questo processo è assicurato da entrambi gli enzimi 2 piridossale 5' fosfato dipendenti : cistationina- $\beta$ -sintetasi e la cistationina- $\gamma$ -liasi (Chen et al. 2004).

CBS e CSE sono ampiamente espresse nei tessuti dei mammiferi, ma la loro distribuzione non è omogenea (Kamoun 2004).

Per esempio la CBS si ritiene che sia espressa in modo predominante nel sistema nervoso centrale e usualmente assente nei tessuti vascolari

dove potrebbe essere indotta solamente in particolari condizioni (Robert et al. 2003).

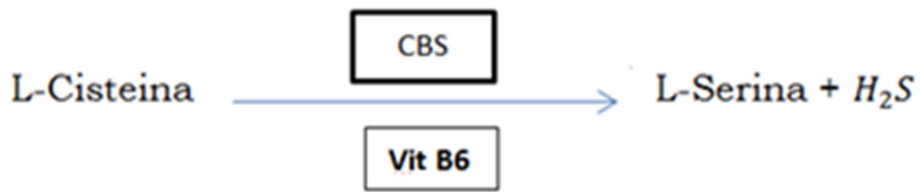
Al contrario CSE è ritenuta la principale fonte di  $H_2S$  nel sistema cardiovascolare dove la quantità di  $H_2S$  prodotta si stima che rientri nel range di 3-6 nanomoli/min/g di tessuto (Ishii et al. 2004).

Sebbene originariamente si ritenesse che la CSE fosse espressa nelle cellule della muscolatura liscia vascolare, ma non nelle cellule endoteliali (Zhao et al 2001, Wang 2003), recenti studi immunoistochimici hanno proposto che la CSE sia localizzata principalmente a livello delle cellule endoteliali, mentre sembra essere poco espressa nelle cellule della muscolatura liscia.

Inoltre la delezione genetica di CSE causa una diminuzione significativa della concentrazione di  $H_2S$  nel sangue e negli organi del sistema cardiovascolare dei topi, che è accompagnata da ipertensione e ridotta risposta vasorilasciante (Yang et al. 2008)

Nei tessuti dei mammiferi l' $H_2S$  è prodotto attraverso almeno 4 vie diverse di biosintesi.

Nella prima via biosintetica (figura 4), la CBS idrolizza L-Cisteina formando una quantità equimolare di L-Serina e solfuro di idrogeno (Porter et al. 1974).



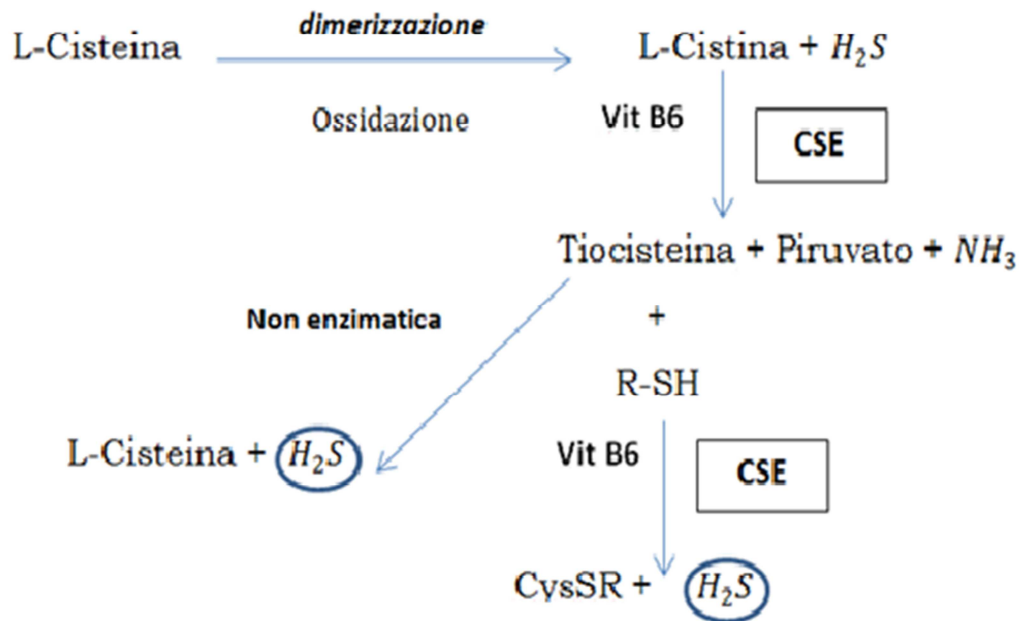
**Figura 4.** Prima via biosintetica.

Nella seconda via biosintetica (figura 5) due molecole di L-Cisteina reagiscono per formare L-Cistina (dimero di L-Cisteina), che si scinde in tiocisteina, piruvato ed ammoniaca attraverso una reazione CSE mediata.

A sua volta la tiocisteina può essere sottoposta a due diversi processi :

- uno non enzimatico, dando come risultato la formazione di L-Cisteina e  $\text{H}_2\text{S}$  (Cavallini et al. 1962);
- l'altro è una reazione CSE dipendente con un composto tiolico R-SH (come cisteina o glutathione) dando come prodotti,  $\text{H}_2\text{S}$  e CysS-R (Stipanuk and Beck 1982, Yamanishi and Tuboi 1981).

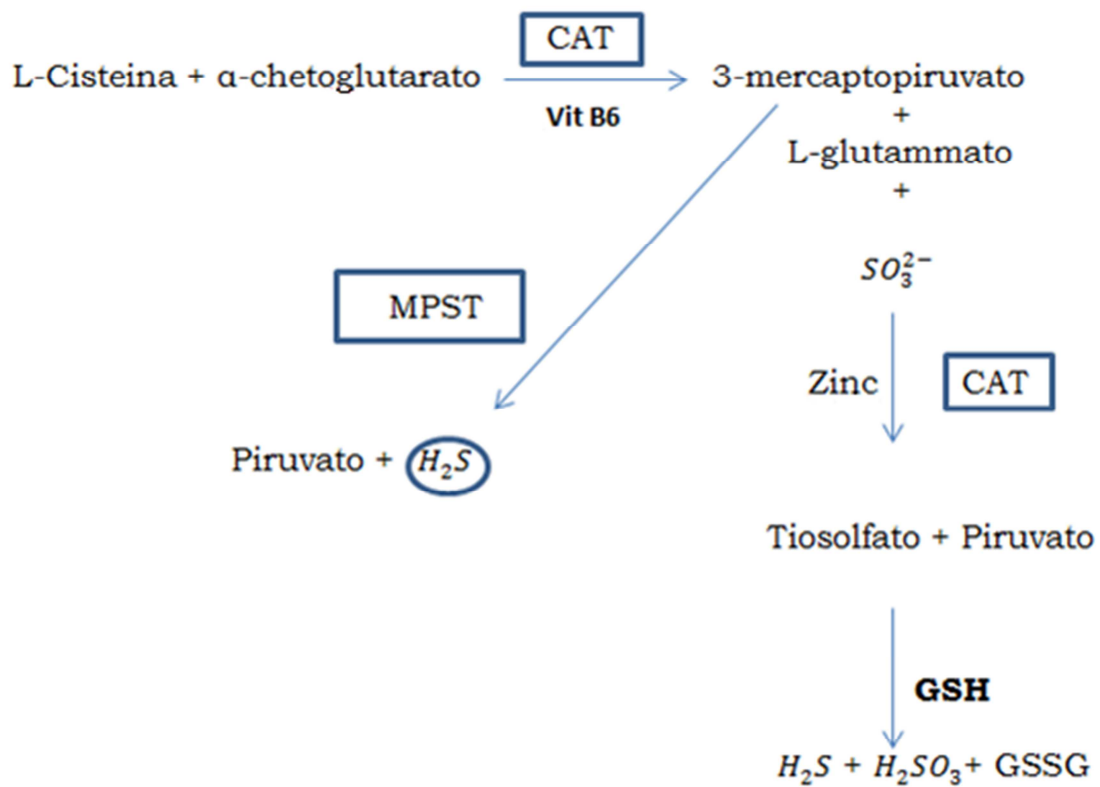




**Figura 5.** Seconda via biosintetica

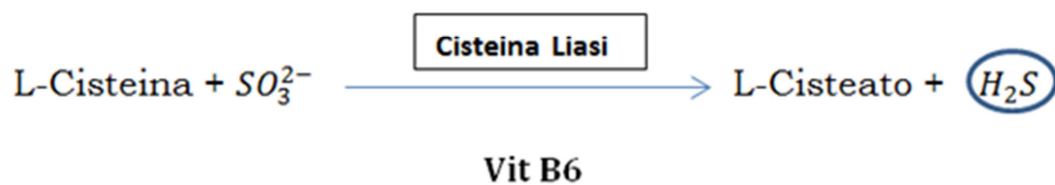
La terza via (figura 6) coinvolge la partecipazione dell'enzima cisteina aminotransferasi (CAT) che catalizza la reazione tra L-Cisteina e  $\alpha$ -Chetoglutarato portando alla formazione di 3-Mercaptopiruvato ed L-Glutammato; il primo composto può essere così desolfurato dalla 3 mercaptopiruvato solfo transferasi (MPST) per dare piruvato e solfuro di idrogeno (Kuo et al. 1983, Shibuya et al. 2009).

In alternativa quando gli ioni solfito ( $SO_3^{2-}$ ) sono disponibili, il 3-mercapto piruvato può essere convertito a piruvato e tiosolfato ( $S_2O_3^{2-}$ ) che a sua volta può reagire col glutathione ridotto (GSH) e produrre  $H_2S$ ,  $H_2SO_3$  e glutathione ossidato (GSSG).



**Figura 6.** Terza via biosintetica

Nella quarta via biosintetica (figura 7) la L-Cisteina ed il solfito sono convertiti ad L-Cisteato e  $\text{H}_2\text{S}$  dalla cisteina liasi (Li and Moore 2009).



**Figura 7.** Quarta via biosintetica

Alcuni fattori endogeni ed esogeni possono influenzare l'attività della CBS e della CSE. Nel cervello l'attività della CBS è regolata dal  $Ca^{2+}$  e dalla calmodulina; inoltre la produzione di  $H_2S$  CBS-dipendente è aumentata da fattori che portano ad una crescita del  $Ca^{2+}$  intracellulare, come gli agonisti glutamminergici che attivano i recettori N-metil-D-aspartato (NMDA) ed i recettori  $\alpha$ -amino-3-idrossi-5-metil-4-isossazolopropionato (AMPA).

Al contrario si pensa che l'NO inattivi la CBS. Al riguardo, il paradossale incremento dell'attività della CBS promossa in vitro dal sodio nitroprussiato, donatore di NO, è indipendente dalla sua capacità di rilasciare NO ed è stato spiegato da una diretta modificazione della CBS (Eto and Kimura 2002, Eto et al. 2002, Taoka and Banerjee 2001).

Quando consideriamo il sistema cardiovascolare, la generazione di  $H_2S$  CSE-mediata è aumentata dal donatore di NO in un modo cGMP dipendente. In parallelo è stato scoperto che gli inibitori della NO-sintasi riducono la produzione di  $H_2S$  (Zhao et al. 2003).

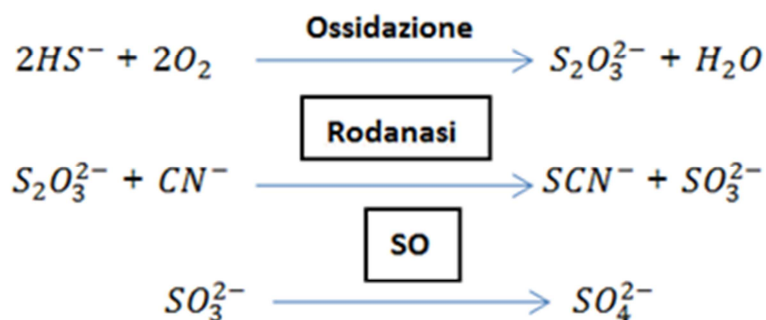
### 1.3.2 Catabolismo

In riferimento alla via responsabile della degradazione dell' $H_2S$ , è degno di nota che l' $H_2S$  è un'importante specie riducente che può essere facilmente consumata da una varietà di agenti ossidanti (Whiteman et al. 2004, Whiteman et al. 2005, Chang et al. 2008, Geng et al. 2004).

Un'altra via importante del catabolismo dell' $H_2S$ , probabilmente la principale, si realizza nei mitocondri. In particolare, è stato recentemente osservato che nel fegato di ratto i mitocondri possono efficientemente ossidare l' $H_2S$  con un consumo di ossigeno circa quattro volte minore di quello osservato per l'ossidazione del substrato fisiologico succinato.

Questo processo ossidativo è prevenuto dagli inibitori dei complessi III e IV della catena respiratoria, ovvero mixotiazolo e cianuro.

Il meccanismo d'ossidazione procede attraverso alcuni step enzimatici, mediati dalla chinone ossidoreduttasi, dalla S-diossigenasi, e dalla S-transferasi portando alla formazione di tiosolfato. Il tiosolfato è così biotrasformato, dalla rodanasi, in solfito (questa reazione richiede anche la presenza di cianuro, che è convertito in tiocianato) il quale a sua volta viene ossidato a solfato dalla solfito ossidasi (SO) (figura 8) (Goubern et al. 2007, Hildebrandt and Grieshaber 2008).



**Figura 8.** Catabolismo dell' $H_2S$  nei mitocondri

Sebbene il solfato inorganico sia il predominante prodotto finale stabile del catabolismo dell' $H_2S$ , non può essere considerato come un biomarcatore affidabile per un'accurata stima quantitativa della produzione di  $H_2S$  nel sangue dei mammiferi.

Infatti gli ioni solfato possono essere generati anche in altri modi, come la diretta ossidazione della cisteina da parte della cisteina diossigenasi o dalla ossidazione dei solfiti prodotti da altre fonti (Li et al. 2009).

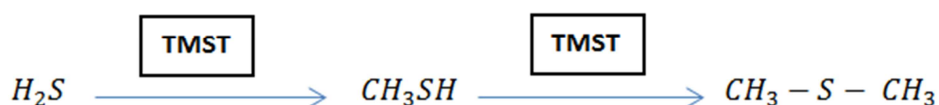
In più, a causa della natura chimica dell' $H_2S$ , l'ordine micromolare di grandezza delle sue concentrazioni plasmatiche, che sono spesso riportate in letteratura, riflette la somma delle specie non dissociate di  $H_2S$  e dei suoi congeneri non dissociati :  $HS^-$  (che è la specie più abbondante a pH fisiologico) e l'anione solfuro  $S^{2-}$  (la cui presenza è trascurabile a pH fisiologico) (Olson 2009).

Son noti anche altri meccanismi, relazionati al catabolismo dell' $H_2S$ . La solfoemoglobina, risultante dalla reazione tra  $H_2S$  e metaemoglobina, può esser vista come un possibile biomarcatore dell' $H_2S$  plasmatico (figura 9) (Kurzban et al. 1999).



**Figura 9 .** Catabolismo di  $H_2S$  nel citosol

Una via alternativa in più che opera solamente nel citosol cellulare e coinvolge quantità minori di  $H_2S$ , è la metilazione dell' $H_2S$  da parte del tiolo S-metiltransferasi che forma metantiolo e dimetilsolfuro (figura 10) (Furne et al. 2001).



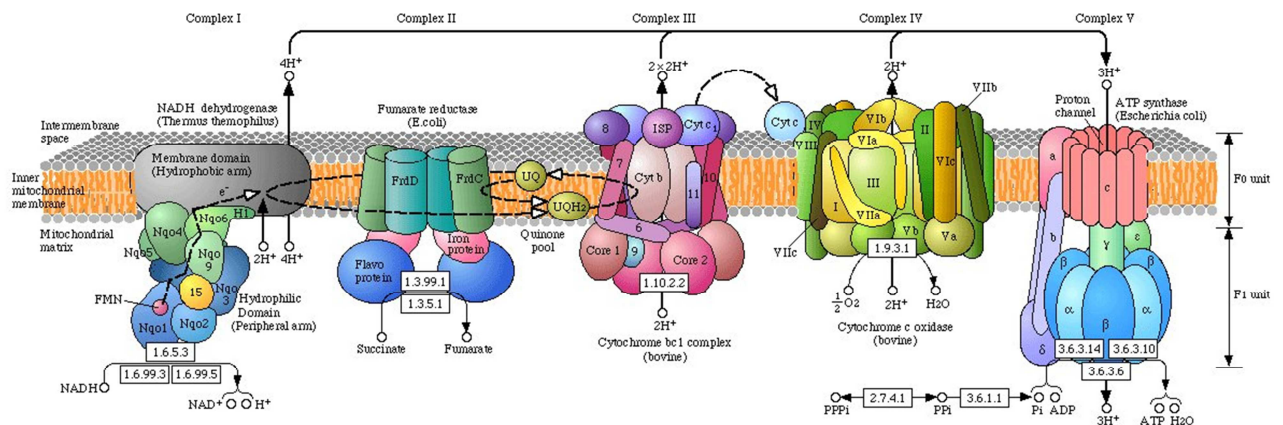
**Figura 10.** Catabolismo dell' $H_2S$  nel sangue

Sono state trovate anche altre vie ossidative minori dell' $H_2S$  a solfito, per esempio nell'attivazione neutrofila (Mitsuhashi et al. 2005).

### 1.3.3 Meccanismi d'azione biologica dell' $H_2S$

In letteratura, è stato ampiamente riportato che concentrazioni relativamente alte di  $H_2S$  (circa  $50\mu M$ ) colpiscono l'attività della catena respiratoria causando una completa inibizione non competitiva del complesso IV, la citocromo ossidasi (Nicholls and Kim 1982, Volkel and Grieshaber 1996).

Comunque recenti evidenze hanno dimostrato che basse concentrazioni di  $H_2S$  ( $< 20\mu M$ ) possono essere un substrato capace di donare elettroni alla catena di trasporto degli elettroni (figura 11) a livello dell'ubichinone (Gaubern et al. 2007).



**Figura 11.** Catena di trasporto degli elettroni.

L'ossidazione del solfuro è catalizzata da un enzima che è stato trovato all'interno della membrana mitocondriale: la solfuro chino reduttasi (Theisen and Martin 2008).

Queste nuove scoperte hanno dimostrato che a basse concentrazioni l' $H_2S$  stimola la fosforilazione ossidativa ed aumenta la biosintesi di ATP. Questo doppio aspetto dell' $H_2S$  suggerisce l'esistenza di un livello soglia del gas capace di discriminare tra un effetto benefico e una serie di eventi citotossici che portano alla morte della cellula (Pun et al 2010).

In linea con il ben conosciuto comportamento chimico dei solfuri organici ed inorganici, la prima spiegazione meccanicistica dell'attività biologica dell' $H_2S$  fu ascritta all'interazione con i sistemi redox. Infatti il solfuro di idrogeno reagisce con almeno 4 specie reattive differenti:

- 1 l'anione radicalico superossido (Mitsuhashi et al. 2005)
- 2 il perossido di idrogeno (Geng et al. 2004)
- 3 il perossinitrito (Whiteman et al. 2004)
- 4 l'ipoclorito (Whiteman et al. 2005)

Questi composti sono ampiamente reattivi e la loro neutralizzazione da parte dell' $H_2S$  si traduce nella protezione delle proteine e dei lipidi dal grave danno indotto da queste molecole.

E' stato trovato un ruolo citoprotettivo non specifico per l' $H_2S$  che risulta anche nella soppressione della produzione delle ROS, nella riduzione dell'espressione della 3-caspasi upregolata, nella prevenzione del calo di GSH e della perdita del potenziale di membrana mitocondriale nei cardiomioblasti di ratto (Chen et al. 2009).



In altri lavori sperimentali è stato mostrato che l' $H_2S$  può ridurre alcuni eventi rilevanti associati con lo stress ossidativo e proteolitico come la nitrificazione dei residui di tirosina e l'attivazione della metalloproteinasi della matrice mitocondriale (Mishra et al. 2010).

Come osservato nelle colture di cellule di neuroblastoma, l' $H_2S$  protegge dallo stress ossidativo tramite due meccanismi: aumenta la produzione di GSH potenziando i trasportatori di Cisteina/Cistina e ridistribuendo GSH ai mitocondri (Kimura et al. 2010).

Tutti questi effetti comunque non possono essere spiegati in maniera piena ed esaustiva tenendo conto solo degli effetti antiossidanti esibiti dall' $H_2S$  e quindi sono ancora necessarie ulteriori investigazioni.

Parallelamente al meccanismo d'azione non specifico il solfuro di idrogeno può anche esercitare i suoi effetti attraverso specifici targets molecolari; in particolare, è stato dimostrato che in alcuni sistemi le azioni dell' $H_2S$  sono mediate dall'attivazione dei canali del potassio ATP sensibili ( $K_{ATP}$ ) e consistentemente alcuni effetti dell' $H_2S$  sono mimati da altri attivatori  $K_{ATP}$  come il pinacidil o il diazossido, e aboliti dai bloccanti  $K_{ATP}$  come la glibenclamide.

## 1.4 Canali $K_{ATP}$

I canali  $K_{ATP}$  sono per lo più ubiquitari ed il loro ruolo è particolarmente importante nella regolazione delle funzioni biologiche in alcuni tessuti/sistemi come le cellule pancreatiche, i neuroni, le cellule del miocardio, del muscolo scheletrico e della muscolatura liscia.

Quindi l' $H_2S$ , che ha mostrato la capacità di attivare questi canali, sembra rivestire un ruolo importante nei meccanismi di trasduzione che portano ad alcuni importanti effetti biologici e questa caratteristica farmacodinamica svela prospettive affascinanti per la potenziale utilità farmacoterapeutica di farmaci che agiscono sulla via biosintetica dell' $H_2S$ .

Infatti i canali  $K_{ATP}$  sono considerati come efficienti meccanismi biologici capaci di correlare lo status metabolico della cellula con la sua eccitabilità, poiché i livelli intracellulari di ATP e ADP sono i fattori chiave che determinano rispettivamente l'inibizione e l'attivazione dei canali.

In particolare, in condizioni di sufficiente potenziale di fosforilazione, alti livelli di ATP rappresentano il prevalente fattore di inibizione sull'attività del canale. Al contrario in condizioni di ridotto metabolismo energetico legato alla crescita in ADP e alla diminuzione del rapporto ATP/ADP il canale è attivato e assicura un flusso in uscita di ioni potassio con conseguente iperpolarizzazione della membrana.

Questo meccanismo peculiare di attivazione/inattivazione metabolismo-dipendente rende il canale  $K_{ATP}$  un fattore centrale, profondamente coinvolto nella regolazione di alcune funzioni biologiche incluse l'attività cardiaca, il tono muscolare liscio, la secrezione d'insulina, il rilascio di neurotrasmettitori etc. (Nichols 2006).

#### *1.4.1 Regolazione dei canali al potassio ATP sensibili*

Nei miociti l'apertura del canale  $K_{ATP}$  è sensibile alle varie condizioni metaboliche: infatti è inibita da un'alta concentrazione di ATP e attivata da nucleosidi difosfato intracellulari.

L'inibizione del canale può essere innescata anche da analoghi dell'ATP non idrolizzabili, essendo indotta dal semplice legame dell'ATP al canale. L'ATP esplica la sua azione sia in forma complessata con lo ione  $Mg^{+}$  che in forma di acido libero ( $ATP_4^{-}$ ); gli effetti inibitori esplicati dai nucleosidi probabilmente coinvolgono la subunità Kir6.2.

Molti studi affermano che i canali  $K_{ATP}$  possono essere modulati anche dal pH, dall'NO, dall'adenosina, dall'acetilcolina etc. (Mannhold 2004)

I canali  $K_{ATP}$  in condizioni fisiologiche si trovano solitamente in uno stato chiuso o inattivato, mentre durante un'ischemia o in generale durante una condizione di stress metabolico la loro apertura è

aumentata da una diminuzione di ATP e da un accumulo di metaboliti ischemici.

Quindi questo canale agisce sia come un modulatore che come un sensore del metabolismo energetico della cellula, svolgendo un ruolo fondamentale per la protezione del cuore dall'insulto ischemico (O'Rourke et al. 1994, Fujita and Kurachi 2000).

In particolare i canali  $K_{ATP}$  sono stati riscontrati a due livelli :

- sulla membrana sarcolemmatica (sarc- $K_{ATP}$ );
- sulla membrana mitocondriale interna (mito- $K_{ATP}$ ).

Essi presentano una funzione diversa, infatti si ritiene che l'apertura dei sarc- $K_{ATP}$  nel miocardiocita, indotta o da uno stato di ipossia, o da uno stato ischemico, o da attivatori farmacologici, dopo la depolarizzazione, acceleri la ripolarizzazione della membrana, causando un accorciamento della durata del potenziale d'azione e prevenendo lo scambio  $Na^+/H^+$ , con la conseguente inibizione dell'ingresso di  $Ca^{2+}$  nella cellula. Quindi evitando un dannoso accumulo di  $Ca^{2+}$ , consentono così di riequilibrare il bilancio tra apporto e richiesta di energia (Noma 1983).

Infatti, usando il diazossido, un attivatore dei canali  $K_{ATP}$ , è stata notata una riduzione di  $Ca^{2+}$  a livello mitocondriale e la prevenzione del suo sovraccarico (Holmuhamedov et al. 1998, Holmuhamedov et al. 1999).

Mentre gli studi effettuati sui canali mito- $K_{ATP}$  associano la loro attivazione, in gran parte o esclusivamente, all'IPC o

precondizionamento ischemico (ossia un fenomeno di riassetto del miocardio durante brevi episodi ischemici, che determinano l'autodifesa del miocardio stesso contro successivi episodi ischemici), escludendo così il ruolo dei canali sarc- $K_{ATP}$  (Mubagwa and Flameng 2001, Sato et al. 2000).

La sintesi dell'ATP all'interno della cellula avviene grazie ai mitocondri, quindi in caso di crisi energetica questa funzione viene incrementata ed il potenziale di membrana viene in parte ripristinato dall'apertura dei canali mito- $K_{ATP}$  (Szewczyk 1996, Xu et al. 2001).

#### *1.4.2 I canali sarc- $K_{ATP}$*

Grazie all'azione di un bloccante dei canali sarc- $K_{ATP}$ , l'HMR 1883, una sulfaniltiourea capace di ritardare la caduta del potenziale d'azione e ridurre l'effetto protettivo del diazossido, è stato possibile ipotizzare il coinvolgimento dei canali sarc-  $K_{ATP}$  nell'IPC (Rodrigo et al. 2004).

Durante l'inibizione metabolica, nei miociti di coniglio, l'attivazione della PKC e l'influenza dell'adenosina incrementano il flusso di ioni attraverso i canali  $K_{ATP}$ , effetto abolito dagli antagonisti selettivi dell'adenosina.

È stato osservato che in un episodio ischemico transitorio aumentano i livelli di adenosina e in seguito si attivano i recettori A1 e A3;

per questo l'apertura dei sarc- $K_{ATP}$  si pensa che sia dovuta ad un sinergismo tra l'attivazione dei recettori adenosinici e la fosforilazione della PKC (Liu et al. 1996).

Anche l'NO ha mostrato la capacità di attivare i sarc- $K_{ATP}$  sia in condizioni di normossia che di ipossia (Baker et al. 2001).

Vari studi affermano che il rilascio di NO endogeno non è implicato nelle prime fasi dell'IPC che sono innescate somministrando NO esogeno (Rakhit et al. 1999).

Probabilmente l'iperpolarizzazione dovuta all'attivazione dei canali sarc- $K_{ATP}$  può portare anche all'attivazione dei mito- $K_{ATP}$ : in queste condizioni l'iperpolarizzazione della membrana comporta l'attivazione della fosfolipasi D che a sua volta attiva e fa traslocare la PKC responsabile dell'apertura di tutti e due i canali (Waring et al. 1999).

Altre teorie suggeriscono che l'attivazione dei sarc- $K_{ATP}$  sia capace di indurre l'apertura anche dei mito- $K_{ATP}$  e/o viceversa; questa teoria è stata dimostrata somministrando l'acido 5 idrossi decanoico, 5HD, un bloccante selettivo dei canali mito- $K_{ATP}$ , e l'HMR 1098, una sulfanilurea che blocca selettivamente i canali sarc- $K_{ATP}$ . Questi bloccanti, solo se dati in associazione, abolivano del tutto l'effetto protettivo dell'ipossia cronica (Kong et al. 2001).

Inoltre, studi recenti, asseriscono che l'IPC sia solo in parte antagonizzato dal 5-HD, ma abolito totalmente dalla glibenclamide, un antagonista non selettivo dei canali  $K_{ATP}$  (Sanada et al. 2001).

### 1.4.3 I canali mito- $K_{ATP}$

Nel 1980 per la prima volta è stato ipotizzato il ruolo protettivo esercitato da questi canali, quando si è notato che il nicorandil proteggeva dal danno ischemico (anche se il meccanismo d'azione non è stato compreso). In seguito l'ipotesi è stata confermata dalla somministrazione di un attivatore non selettivo dei  $K_{ATP}$ , il bimakalim che esercita un effetto cardioprotettivo sia a bassi che ad elevati dosaggi. Quindi tali dati suggerivano la presenza di un sito intracellulare responsabile della cardioprotezione (Yao and Gross 1994). La prima evidenza a favore del ruolo protettivo a livello cardiaco di questi canali fu provata osservando che il diazossido, nei mitocondri di cuore bovino, induceva l'apertura dei mito- $K_{ATP}$  ad una concentrazione minore rispetto a quella necessaria per attivare i sarc- $K_{ATP}$ .

L'effetto del farmaco veniva inibito non solo dalla glibenclamide, ma anche dal 5-HD dimostrando così il maggior coinvolgimento di questi canali (Garlid et al. 1997).

L'attivazione e la traslocazione della PKC sembra essere fondamentale per l'apertura dei canali  $K_{ATP}$  mitocondriali. Infatti la protezione indotta dalla loro apertura si può abolire con gli antagonisti della PKC e la protezione esercitata da quest'ultima si può inibire mediante dei bloccanti mito- $K_{ATP}$ . Quindi queste due componenti risultano necessarie e co-dipendenti nella cardioprotezione (Gaudette et al. 2000).

Studi successivi hanno mostrato, grazie al fatto che sia la glibenclamide che il 5-HD attenuano il preconditionamento PKC mediato, che l'attivazione della PKC avviene prima di quella dei canali mito- $K_{ATP}$ .

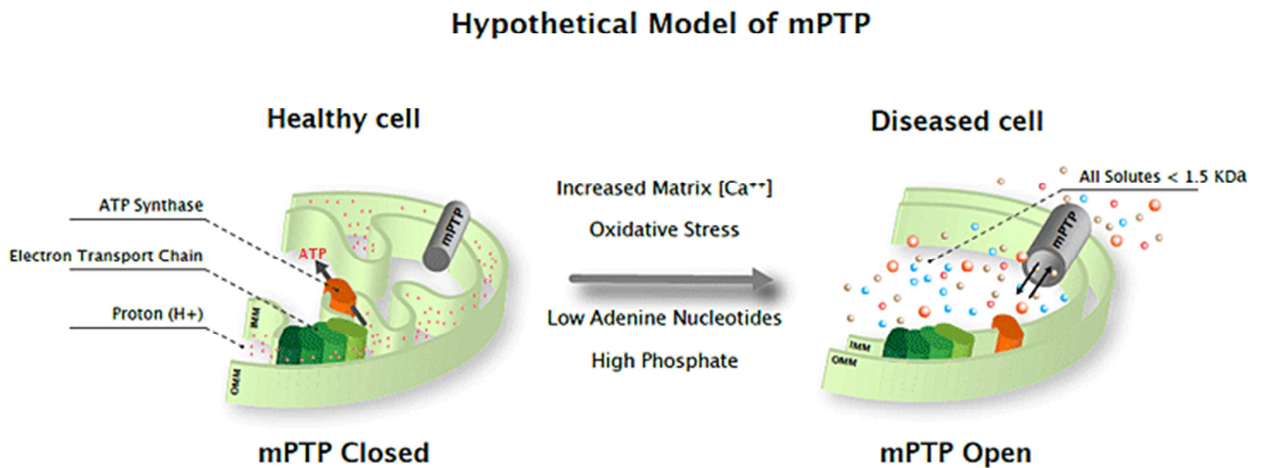
Inoltre il pretrattamento con diazossido porta ad una riduzione dell'entità dell'infarto, senza accelerare la traslocazione della PKC e l'effetto protettivo legato all'IPC, viene abolito dal 5-HD, ma senza bloccare la traslocazione della proteina (Ohnuma et al. 2002, Nozawa et al. 2003). L'apertura dei mito- $K_{ATP}$  è influenzata positivamente dall'NO, visto che il diazossido è in grado di indurre sia un IPC precoce che ritardato, tramite una via NO-dipendente (Ockaili et al. 1999, Sarre et al. 2005).

Sono stati rilevati dei dati controversi per quello che riguarda le ROS: da una parte si afferma che la loro produzione sia essenziale per la cardioprotezione, poiché attivando le chinasi aumenta la probabilità che si aprano i canali mito- $K_{ATP}$ ; dall'altro lato il rilascio di ROS sembra favorire l'apertura del poro di transizione di permeabilità mitocondriale (mPTP) nel periodo di riperfusione (Vanden et al. 1998).

Sebbene nella riperfusione, l'apertura prolungata di tale poro sia considerata una delle principali cause di morte cellulare (figura 12), il rilascio delle ROS e un'apertura transitoria dell'mPTP nella fase d'innescio dell'IPC sono stati ipotizzati come fattori responsabili della cardioprotezione, poiché in tal modo si eviterebbe l'accumulo di  $Ca^{2+}$  e



quindi un'apertura prolungata dell'mPTP  $Ca^{2+}$ -indotta (Hausenloy et al. 2004).



**Figura 12.** Apertura prolungata del poro mPTP.

Altre fonti suggeriscono che la produzione delle ROS sia seguita da una risposta inibitoria capace di ridurre la produzione stessa (Juhaszova et al. 2004).

#### *1.4.4 Meccanismo di protezione esercitato dai canali mito- $K_{ATP}$*

Il potenziale di membrana regola il flusso degli ioni  $K^+$  attraverso la membrana mitocondriale, mentre la loro fuoriuscita è compensata dall'antiporto  $K^+/H^+$ , che rimuove  $K^+$  in base al gradiente protonico.

L'entrata di ioni potassio nel mitocondrio crea due effetti differenti nel muscolo cardiaco e dipendenti dallo status bioenergetico. In condizioni

fisiologiche il flusso di ioni  $K^+$  in entrata è minimo, come gli effetti sul potenziale di membrana mitocondriale, ma l'influsso dello ione provoca un modesto aumento volumetrico della matrice. Altra funzione fisiologica riguardante l'apertura dei mito- $K_{ATP}$  è la regolazione e la ricaptazione di  $Ca^{2+}$  (Garlid et al. 2003a).

Aprendosi i canali mito- $K_{ATP}$  provocano un'alcalinizzazione della matrice ed un modesto aumento della produzione mitocondriale delle ROS, che a cascata attivano le chinasi, che attivano i canali per un lungo periodo di tempo (Garlid et al 2003b).

Nell'ischemia si osserva invece che l'apertura dei mito- $K_{ATP}$  provvede a mantenere l'omeostasi del volume della matrice, quindi la giusta distanza tra le due membrane mitocondriali che regolano la permeabilità ai nucleotidi (ADP e ATP).

La permeabilità della membrana, in condizioni fisiologiche è bassa poiché i trasferimenti di energia tra citosol e mitocondrio sono mediati dalla creatina e dal creatin-fosfato, mentre in condizioni ipossiche la permeabilità della membrana esterna aumenta, si aprono i mito- $K_{ATP}$  favorendo un aumento del flusso degli ioni potassio assieme alla diffusione di acqua e alla captazione di anioni creando dunque una espansione della matrice (Rostovtseva and Colombini 1997, Schlattner et al. 2001). Questo effetto riduce l'idrolisi di ATP, favorendo un gradiente utile per la sintesi di ATP, così da ottenere un miglior recupero funzionale (Garlid 2000). L'apertura dei mito- $K_{ATP}$  inibisce

l'incremento di concentrazione intramitocondriale di  $Ca^{2+}$  poiché il potenziale di membrana mitocondriale diminuisce, riducendo anche il gradiente elettrochimico di tale ione (Holmuhamedov et al. 1998, Holmuhamedov et al. 1999).

### 1.5 Attivatori e bloccanti dei canali $K_{ATP}$

Per identificare la funzione dei canali  $K_{ATP}$  ed in particolare del ruolo dei sarc- e dei mito- $K_{ATP}$  nell'IPC, vengono usati agonisti e antagonisti selettivi di questi canali anche se non è facile ottenere molecole che discriminino in maniera chirurgica fra gli uni e gli altri; perciò spesso, i composti che attivano i canali mito- $K_{ATP}$ , attivano anche quelli di tipo sarc- nei cardiomiociti e nelle cellule della muscolatura liscia, causando una vasodilatazione periferica ed una riduzione della durata del potenziale d'azione.

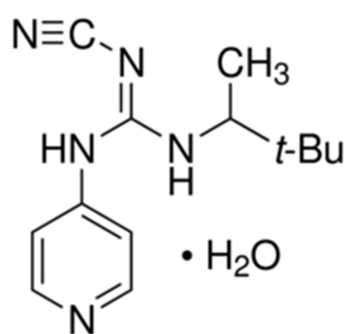
In conseguenza di ciò l'obiettivo dei ricercatori, poiché molti studi hanno dimostrato che l'effetto cardioprotettivo è indipendente dall'azione vasodilatatoria, è stato quello di creare composti selettivi per i due sottotipi di canali, in particolare attivi su quelli mito-, ma inattivi su quelli sarc- (Testai et al. 2007) .

### 1.5.1 Attivatori dei canali $K_{ATP}$

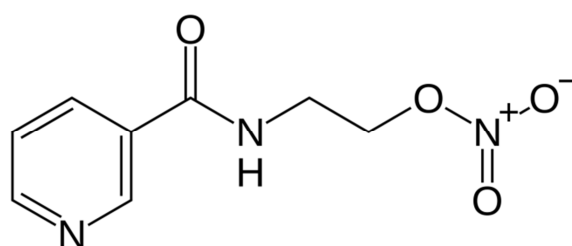
Attualmente, gli strumenti che i ricercatori hanno a disposizione per lo studio di questi canali sono (figura 13) :

- Cromakalim : fu il primo farmaco ad essere usato come attivatore, è un composto con struttura benzopiranic, privo di selettività, usato solo in ambito sperimentale (Mannhold 2004).
- Pinacidil : appartiene alla classe delle ciano guanidine, e da esso è stata sviluppata una serie di N-alchil-N'-piridiltioureie con attività antipertensiva (Peterson et al. 1978). In particolare ne è stata sintetizzata una, la P-1075, con potente attività, poiché si lega con elevata affinità alla subunità SUR2A e SUR2B; di conseguenza è stata proposta come agonista selettivo dei canali sarc- $K_{ATP}$  per chiarire il contributo di questi ultimi nell'IPC. Gli effetti benefici sono antagonizzati da un bloccante selettivo dei sarc-, l'HMR 1098, rafforzando l'ipotesi che essa agisca proprio su questo sottotipo recettoriale (Backzo et al. 2005).
- Nicorandil : nitrato piridinico che mostra un'ulteriore azione vasodilatatoria grazie alle sue proprietà di NO-donatore (Peterson et al. 1978).
- Diazossido : prototipo della classe delle benzotiazine; in condizioni normali attiva in modo abbastanza selettivo i mito- $K_{ATP}$  senza attivare i sarc- (Yao and Gross 1994). Tuttavia è l'unico farmaco capace di legarsi con simile affinità sia alla subunità SUR1 che a

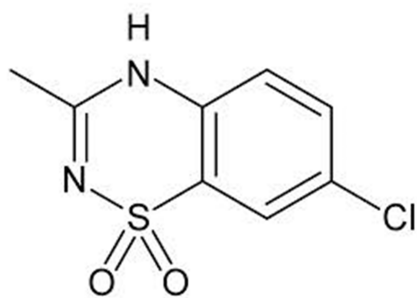
quella SUR2B, causando vasodilatazione e un'inibizione della secrezione d'insulina : quindi il suo uso è correlabile ad un effetto iperglicemico (Antoine et al. 1992, Pirotte et al. 1993)



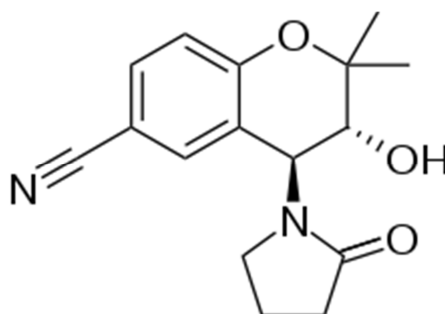
Pinacidil



Nicorandil



Diazossido



Cromakalim

**Figura 13.** Attivatori dei canali  $K_{ATP}$

### 1.5.2 Bloccanti dei canali $K_{ATP}$

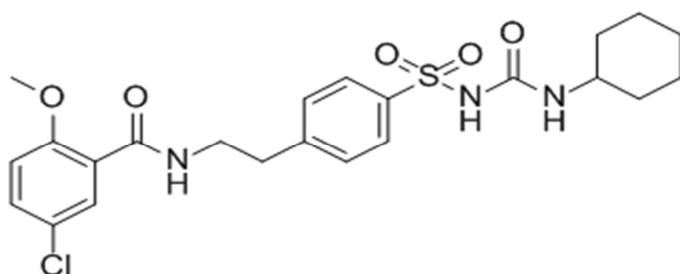
Nella pratica sperimentale si usano solitamente tre tipi di bloccanti (figura 14):

- Glibenclamide: sulfanilurea che agisce sui canali  $K_{ATP}$  in modo non selettivo quindi il suo uso serve a dimostrare la selettività verso il canale  $K_{ATP}$ , ma non verso i suoi due sottotipi mito- e sarc- $K_{ATP}$ .
- 5-HD (Sodio 5-idrossidecanoato): si usa in ambito sperimentale per valutare il potenziale coinvolgimento dei canali mito- $K_{ATP}$ , poiché attualmente rappresenta l'unico inibitore selettivo di tali canali.

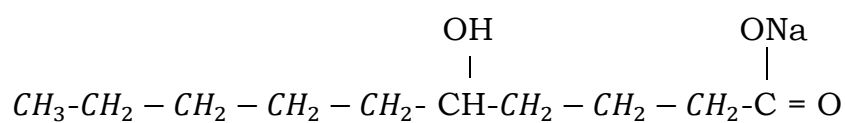
La prima evidenza di tale attività si ottenne tramite esperimenti su mitocondri cardiaci isolati di ratto, su cui è stato misurato il flusso degli ioni potassio (flusso indotto col diazossido): somministrando questo bloccante il flusso veniva inibito.

Alcuni autori suggeriscono che possa avere un'azione indipendente da quella esercitata sui canali e correlabile con un'azione sul metabolismo energetico mitocondriale (Jauburek et al. 1998).

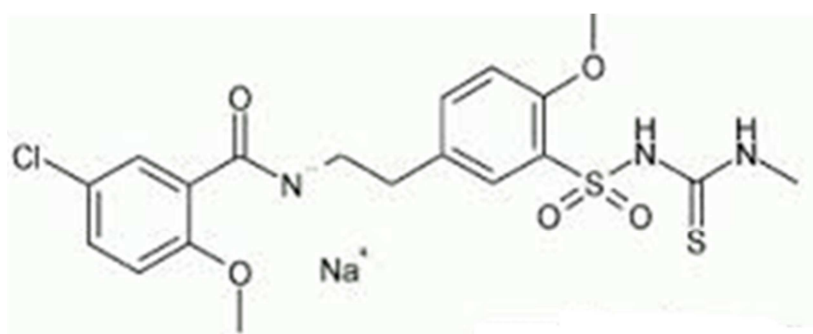
- HMR 1098: sulfaniltiurea antagonista dei sarc- $K_{ATP}$ , ottenuta tramite delle modificazioni della struttura della glibenclamide.



Glibenclamide



5-HD

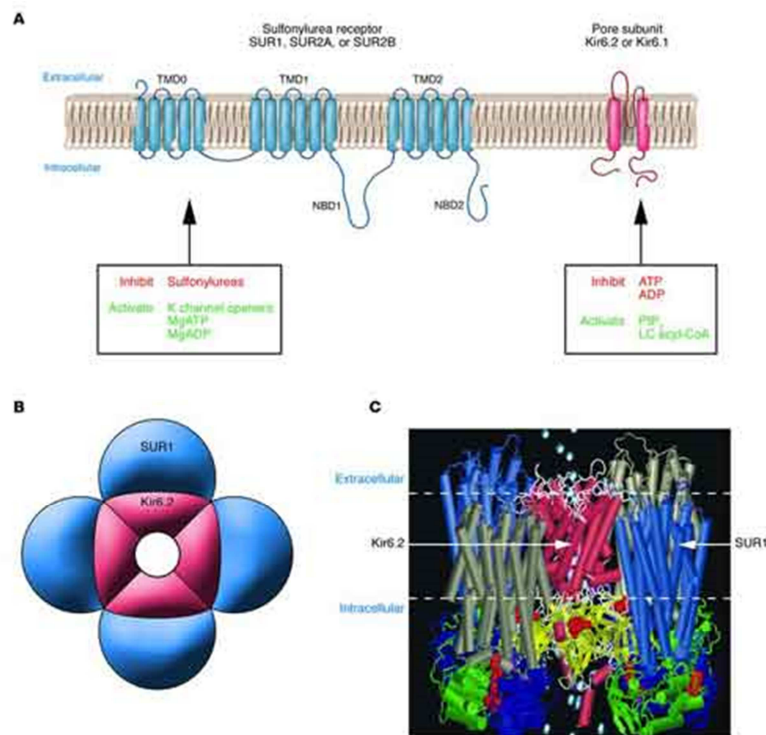


HMR 1098

**Figura 14.** Bloccanti dei canali  $K_{ATP}$

## 1.6 Struttura del canale $K_{ATP}$

Il canale  $K_{ATP}$  esibisce un'architettura etero ottamerica (figura 15).



**Figura 15.** Struttura del canale  $K_{ATP}$

Esso è composto dalla combinazione di due tipi di subunità transmembrana:

- proteine formanti il poro appartenenti alla famiglia dei canali del potassio inward rectifying (Kir);
- proteine regolatorie conosciute come subunità SUR (recettori della sulfanilurea), le quali sono membri di proteine cassette ATP leganti e possono esser viste come sensori del rapporto ATP/ADP.



In particolare i canali  $K_{ATP}$  sono formati da 4 proteine Kir appartenenti alla sottofamiglia 6 (Kir 6) e ognuna delle quelle è associata ad una subunità SUR (Miki and Seino 2005, Bryan 2004).

Due sottotipi di proteine Kir6 (classificate come Kir6.1 e Kir6.2) e 3 sottotipi di SUR (SUR1 e le varianti di splicing SUR2A e SUR2B) sono note per esser coinvolte nella struttura dei canali  $K_{ATP}$  (Inagaki et al. 1995, Matsuo et al. 2005).

I diversi tessuti esprimono i canali  $K_{ATP}$  formati da varie combinazioni di subunità Kir6-SUR . Tipicamente i canali pancreatici sono composti da una combinazione di Kir6.2 e SUR1; i canali cardiaci risultano formati da Kir6.1 e SUR2A, la muscolatura vascolare liscia esprime canali  $K_{ATP}$  formati da Kir6.1 e SUR2B, mentre i canali della muscolatura liscia non vascolare sono una combinazione di Kir6.2 e SUR2B.

Il canale  $K_{ATP}$  mostra un alto livello di complessità strutturale poiché contiene 96 domini di transmembrana e 12 siti di legame dei nucleotidi. Varie classi di farmaci (o di composti endogeni) che agiscono come attivatori  $K_{ATP}$  o come bloccanti esercitano il loro effetto attraverso interazioni molecolari con differenti siti d'azione.

Considerando l' $H_2S$ , sebbene la sua interazione molecolare con i canali  $K_{ATP}$  sia ancora poco chiara, recenti scoperte basate su esperimenti di

mutazioni puntiformi “site-directed” hanno provveduto alla prima intrigante spiegazione.

In particolare attraverso l'espressione eterologa delle subunità Kir6.1 e del SUR1 nella linea cellulare HEK-293 è stato mostrato che l'attivazione  $H_2S$  indotta del canale  $K_{ATP}$  richiede obbligatoriamente la coespressione di entrambe le subunità, mentre il solfuro di idrogeno risulta inattivo quando solamente la subunità Kir 6.1 è espressa. Se ne deduce come conseguenza che il sito d'interazione tra l' $H_2S$  ed il canale  $K_{ATP}$  è localizzato nella subunità SUR ed in particolare nella sua porzione N-terminale extracellulare (Jiang et al.2009).

Oltre al canale del potassio ATP sensibile, un altro tipo di canale del potassio, sembra rappresentare un possibile target per l'azione del solfuro di idrogeno in alcuni sistemi: il canale del potassio calcio attivato ( $K_{Ca}$ ).

## 2. Scopo della ricerca

Questa ricerca ha lo scopo di mettere a punto un modello di stress ossidativo, attraverso un approccio sperimentale, che impiega una linea cellulare, H9c2, di cardiomioblasti di ratto al fine di investigare l'evento ossidativo isolando la componente dei cardiomiociti dagli altri tessuti cardiaci, come quello vascolare, necessariamente presenti in altri modelli sperimentali più complessi.

Come secondo obiettivo di questo lavoro di tesi, una volta verificata la ripetibilità e l'affidabilità dell'insulto indotto attraverso perossido di idrogeno, è stata investigata la capacità dell' $H_2S$  (attraverso l'impiego di NaHS, sostanza ampiamente descritta nella letteratura scientifica, quale  $H_2S$ -donor di riferimento) di intervenire in maniera positiva sul danno ossidativo, preservando la vitalità cellulare.

Infine, attraverso l'uso di specifici bloccanti di alcuni canali del  $K^+$ , si è cercato di determinare il target responsabile del meccanismo di cardioprotezione precedentemente individuato.

### 3. Materiali e Metodi

#### 3.1 Linea cellulare

La linea impiegata in questo lavoro sperimentale è quella dei cardiomioblasti di ratto H9c2 (American Type Culture Collection, Rockville, MA, USA) (figura 16). Tali cellule crescono in adesione sviluppando una forma affusolata simile ad una spiga di grano e replicandosi in un arco di tempo che va dalle 24 alle 36 ore. Prima dell'effettiva coltura in incubatore, le cellule quiescenti vengono conservate in un apposito contenitore, detto dewar, contenente azoto liquido a  $-195^{\circ}\text{C}$ . Qui vengono stockate in criotubi, previa dispersione in un mezzo appropriato, definito mezzo di congelamento, composto di mezzo di coltura completo, FBS (siero fetale bovino) e Penicillina/Streptomicina e addizionato di dimetilsolfossido (DMSO) al 10%. L'aggiunta di DMSO si rende necessaria in quanto il DMSO agisce da agente criopreservante impedendo la formazione di cristalli di ghiaccio nella sospensione cellulare.



**Figura 16.** Morfologia della linea cellulare H9c2, cardiomioblasti di ratto

Una volta effettuata la procedura di scongelamento (vedi paragrafo 3.4.1) la sospensione cellulare viene centrifugata allo scopo di separare il pellet dal sovrnatante che verrà aspirato al fine di rimuovere ogni traccia residua di DMSO. Il pellet verrà quindi risospeso in appropriato mezzo di coltura e la nuova sospensione sarà immessa in fiasche T75 al fine di consentire l'adesione e la replicazione.

### 3.2 Mezzi di coltura

Si usano due tipi di mezzi diversi, caratterizzati dalla seguente composizione:

- Mezzo di coltura utilizzato per la replicazione: composto da DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) high glucose (4500mg/l di glucosio oltre a L-Glutammina e piruvato) al quale sono stati addizionati FBS (un fattore di crescita cellulare) per il 10% e una miscela di penicillina e streptomicina per l'1%, al fine di impedire la contaminazione batterica e fungina del mezzo (tutti i prodotti provengono da Sigma Aldrich).
- Mezzo usato per l'insulto ossidativo, detto "di starvation": composto da DMEM "low glucose" (1000 mg/l di glucosio),

mancante di siero fetale bovino, ma nel quale è stato mantenuto l'1% di penicillina e streptomina (Sigma Aldrich).

### 3.3 Sostanze e Soluzioni utilizzate

- Perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ): sostanza usata per indurre il danno ossidativo; madre 14,7M, le sue successive diluizioni sono state effettuate in mezzo di starvation (low glucose) fino ad ottenere le concentrazioni finali di 400, 300, 200, 150, 100 e 50  $\mu$ M (Sigma-Aldrich).
- Dimetilsolfossido (DMSO): sostanza impiegata come solvente e come criopreservante (Sigma).
- NaHS:  $H_2S$ -donor di riferimento, attivatore dei canali  $K_{ATP}$ ; madre in DMSO  $10^{-2}M$  e successive diluizioni in mezzo di starvation fino ad ottenere le concentrazioni finali di 100, 50, 30, 10 e 5  $\mu$ M (Sigma Aldrich).
- Glibenclamide: sulfanilurea bloccante dei canali al potassio  $K_{ATP}$ ; madre in DMSO  $10^{-2}M$  e sue successive diluizioni in mezzo di starvation fino ad una concentrazione di 10  $\mu$ M .
- 5-HD (5-idrossidecanoato): bloccante selettivo dei canali mito- $K_{ATP}$ ; madre in mezzo di starvation  $10^{-2}M$  e sue successive diluizioni fino ad una concentrazione di 500  $\mu$ M .

- Sale di tetrazolio o WST-1 (water soluble tetrazolium salt-1) (cell proliferation reagent): sostanza impiegata per verificare la vitalità cellulare dopo il danno indotto dallo stress ossidativo; color rosa chiaro. Immesso in rapporto 1:10 nel pozzetto (Roche).

### 3.4 Metodiche sperimentali

L'esperimento viene eseguito sotto una cappa a flusso laminare (figura 17) per garantire la sterilità dell'ambiente usando strumenti e mezzi aseptici e adeguatamente sterilizzati.



**Figura 17.** Cappa a flusso laminare

Gli esperimenti si compongono di più fasi :

#### *3.4.1 Fase dello scongelamento*

Viene prelevato un criotubo contenente la linea cellulare H9c2 dal dewar. Questo procedimento deve avvenire velocemente poiché il DMSO è un buon criopreservante ma a temperatura ambiente danneggia le cellule, quindi il criotubo viene immerso a bagno maria (37°) affinché la sospensione si scongeli rapidamente. In seguito la sospensione viene trasferita in una falcon (tubo graduato con tappo a vite) e si aggiungono circa 6 ml di mezzo di coltura (preventivamente riscaldato) tenendo la falcon in agitazione. Dopo di che la falcon viene messa in centrifuga per 5 min a 1100 rpm in modo che si formi un pellet e sia possibile aspirare via il surnatante, quindi il pellet sarà risospeso con circa 4 ml di mezzo di coltura fresco.

Infine la nuova sospensione sarà trasferita in una fiasca T75 contenente 8 ml di mezzo di coltura che verrà posta in incubatore a 37° con aria insufflata contenente  $CO_2$  al 5%.

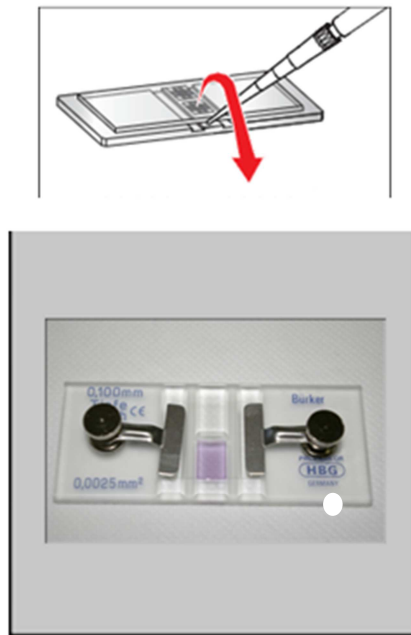
#### *3.4.2 Fase della piastratura*

Si verifica che le cellule contenute nella fiasca abbiano raggiunto la confluenza, ossia che ricoprano praticamente tutta la base del contenitore e poi si procede al lavaggio con PBS e al distaccamento delle cellule per mezzo di 3ml di Tripsina+EDTA (Sigma-Aldrich). La fiasca viene così posta per qualche minuto nell'incubatore ove l'enzima si trova



alla temperatura ottimale per esercitare la propria azione sulle cellule consentendone il distacco dal fondo.

Dopo essersi accertati che le cellule si siano staccate, si aggiungono 7 ml di mezzo per neutralizzare l'effetto della tripsina tramite le proteine contenute nel fattore di crescita. La sospensione così ottenuta viene recuperata e trasferita in una falcon da 15 ml. A questo punto si procede con la conta cellulare immettendo 20  $\mu$ l di tale sospensione nelle camera di Burker (figura 18).



**Figura 18.** Camera di Burker

Utilizzando il microscopio si contano le cellule presenti nel quadrante e sapendo che in ogni  $mm^2$  ci sono 0,1  $\mu$ l di sospensione, possiamo risalire al numero di cellule totali e quindi al volume di sospensione che

dobbiamo prelevare per ottenere il numero di cellule desiderato da seminare nei pozzetti. Per il protocollo eseguito sono state piastrate 8.000 cellule per ogni pozzetto.

I  $\mu\text{l}$  ottenuti verranno sospesi in un determinato volume di mezzo di coltura, dipendente dal numero di pozzetti da piastare, in modo che ogni pozzetto contenga 100  $\mu\text{l}$ . Una volta effettuata la piastratura, si ripone la piastra nell'incubatore.

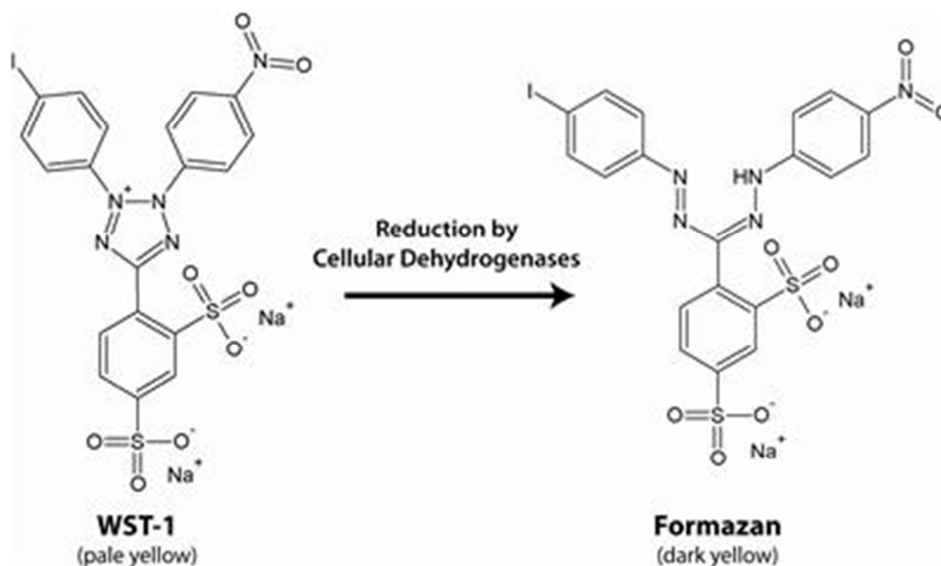
### *3.4.3 Esperimento per trovare la concentrazione di $\text{H}_2\text{O}_2$ che mantenga il 60% della vitalità cellulare*

Il protocollo impiegato in questa fase prevede un trattamento delle cellule H9c2 con  $\text{H}_2\text{O}_2$  in concentrazioni crescenti (50, 100, 150, 200, 300 e 400  $\mu\text{M}$ ). Il  $\text{H}_2\text{O}_2$  viene mantenuto in incubazione per 2 ore al termine delle quali si immettono in ogni pozzetto 10  $\mu\text{L}$  di WST-1 che, una volta posto per 1 ora in incubazione, viene convertito da parte delle cellule vitali in sale di formazano, virando di colore (figura 19).

Questa colorazione avviene grazie ad un meccanismo dipendente dalla formazione glicolitica di NADH e NADPH nelle cellule vitali, quindi la concentrazione di sale di formazano che si forma sarà direttamente proporzionale alla quantità di cellule metabolicamente attive.

La misura dell'assorbanza (Abs) è stata valutata mediante l'uso di un lettore multiplastras, spettrofotometro (Enspire, Perkin Elmer). La vitalità delle cellule esposte all'insulto ossidativo è stata confrontata con quella

delle cellule in stato di normossia, sottraendo ad ogni dato registrato il proprio bianco (valore di Abs dato dall'interazione tra il WST-1 ed il solo trattamento usato per l'esperimento, senza cellule).



**Figura 19.** Conversione del WST-1 in sale di formazano.

#### 3.4.4 Esperimento per valutare l'effetto protettivo dell'NaHS nei confronti del danno ossidativo

Il protocollo impiegato in questa fase prevede un pretrattamento delle cellule H9c2 con NaHS in concentrazioni crescenti (5, 10, 30, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ). Dopo 1 ora d'incubazione con le varie concentrazioni di NaHS, si effettua il trattamento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  200  $\mu\text{M}$  per 2 ore, inducendo così il danno ossidativo. Al termine delle 2 ore di incubazione con  $\text{H}_2\text{O}_2$  vengono aggiunti 10  $\mu\text{l}$  di WST-1 (1:10) a cui segue un ulteriore periodo di incubazione di 1 ora. Infine la lettura dei dati viene effettuata

tramite il lettore multipiastra Enspire (Perkin Elmer) alla lunghezza d'onda di 450 nm.

#### *3.4.5 Esperimento per valutare in seguito al danno ossidativo, l'effetto di un periodo di “riperfusione” con mezzo di coltura high glucose*

L'esperimento viene condotto come illustrato precedentemente, ma al termine del trattamento con  $H_2O_2$  si riperfondono tutti i pozzetti con 100  $\mu$ l di mezzo di coltura high glucose e si pone la piastra in incubatore per 1 ora. Quindi si continua con l'immissione del WST-1 come illustrato precedentemente.

#### *3.4.6 Esperimento per valutare l'azione dell'NaHS previo trattamento con bloccanti dei canali $K_{ATP}$*

Quest'ultimo protocollo prevede un pre-trattamento delle cellule con i bloccanti dei canali  $K_{ATP}$  che vengono incubati per 20 minuti. Quindi si procede col trattamento costituito da NaHS 50  $\mu$ M o rispettivo veicolo (contenente DMSO allo 0,5%) per 1 ora ed infine si induce il danno ossidativo con  $H_2O_2$  200  $\mu$ M per 2 ore.

Al termine delle 2 ore si riperfondono le cellule immettendo nei pozzetti 100  $\mu$ l di mezzo di coltura high glucose e si pone la piastra in incubatore per 1 ora. La lettura dei dati (in seguito all'immissione nei pozzetti di WST-1) viene effettuata tramite Enspire (Perkin Elmer).

### 3.5 Analisi dei dati

L'assorbanza è stata misurata a 450 nm mediante un lettore multiplastra (Enspire, Perkin Elmer). La vitalità cellulare è stata calcolata come percentuale di assorbanza esibita dalle cellule sottoposte ad insulto ossidativo tramite  $H_2O_2$  rispetto alle cellule in condizioni di sola starvation. I valori sono poi stati espressi come media  $\pm$  errore standard (GraphPad Prism 5.0 San Diego, CA, USA).

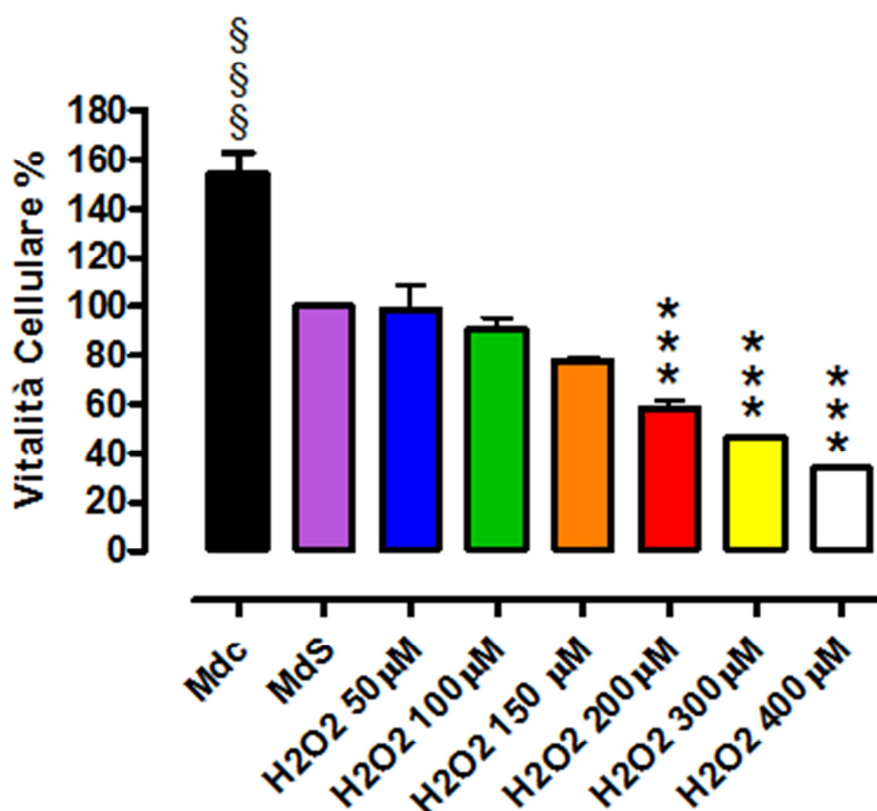
Per la successiva analisi statistica si è utilizzato ANOVA a una via, seguito da post-test di Dunnett con un livello di  $p < 0,05$  assunto come limite di significatività statistica.

## 4. Risultati e discussione

Le patologie da stress ossidativo a livello cardiaco e la necessità di ottimizzare metodologie di studio affidabili e predittive per analizzare la tipologia di danno arrecato da questa noxa sul miocardio (isolandola da altre componenti), hanno ispirato questo lavoro di tesi nel quale è stato messo a punto un modello di danno ossidativo su linea cellulare H9c2 (cardiomioblasti di ratto) e, quale secondo obiettivo, è stata investigata la proprietà dell' $H_2S$  di proteggere da tale danno attraverso meccanismi specifici legati all'apertura dei canali ionici del  $K^+$  ATP-sensibili.

Sebbene i cardiomioblasti siano cellule fenotipicamente diverse dal cardiomiocita maturo e le H9c2 in particolare siano cellule murine e non umane, la linea cellulare H9c2 è stata selezionata per questo studio poiché ha il vantaggio di rappresentare il modello cellulare cardiaco più usato in colture non primarie ed inoltre è stata impiegata in precedenza dal gruppo di ricerca presso il quale si è svolto questo lavoro di tesi, per lo studio sia di modelli di anossia/riperfusioni, che dell'attività protettiva antischemica di diverse classi di farmaci attivatori dei canali  $K_{ATP}$  (Calderone et al. 2010). Per indurre stress ossidativo è stato selezionato come agente ossidante il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ), poiché è il mezzo più usato in letteratura, è facilmente reperibile ed è il protagonista principale nelle patologie da stress ossidativo a livello endogeno.

Nelle nostre condizioni sperimentali l'agente ossidante è stato usato su cellule già esposte ad una condizione di privazione: in particolare l' $\text{H}_2\text{O}_2$  è stato somministrato contestualmente alla privazione di glucosio e di FBS tramite l'uso del mezzo di starvation ed è stato osservato che già questo trattamento, a prescindere dall' $\text{H}_2\text{O}_2$ , è capace di indurre nei tempi della sperimentazione, un certo grado di danno alle cellule H9c2 (grafico 1).



**Grafico 1.** Effetti sulla vitalità cellulare da parte delle crescenti concentrazioni di  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

\* Statisticamente differente dal valore di riferimento (MdS) (\*\*\*) =  $p < 0,001$ .

§ Statisticamente differente dal valore di riferimento (MdS) (§§§ =  $p < 0,001$ ).

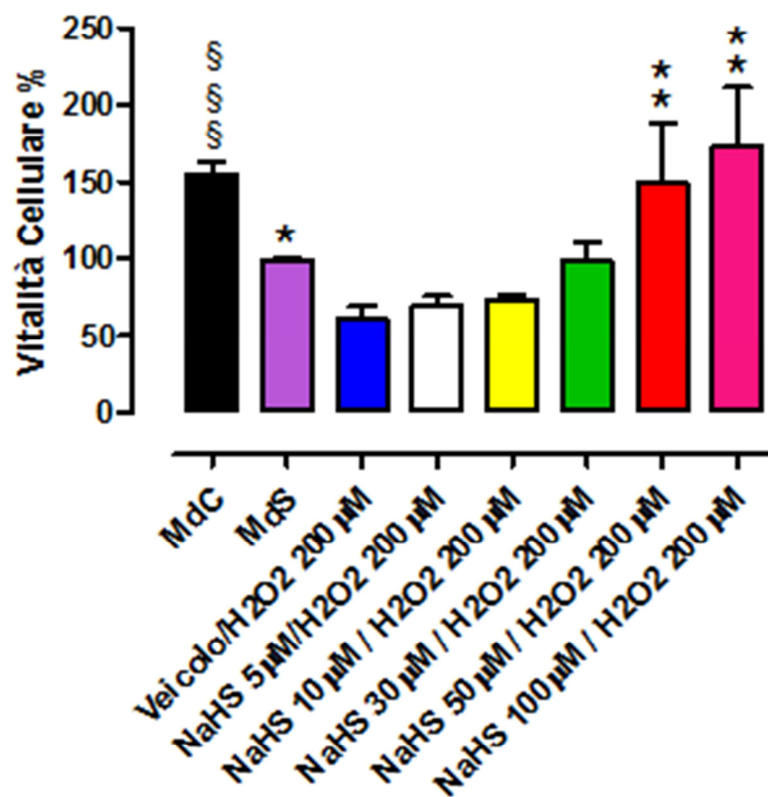
La somministrazione di  $H_2O_2$  ha indotto in modo chiaro e significativo un insulto alla vitalità cellulare in modo concentrazione dipendente.

In particolare il decremento di vitalità cellulare è già evidente alla concentrazione di 150  $\mu M$ , poi si attesta su valori di circa il 50% alla concentrazione di 200  $\mu M$ , fino a livelli particolarmente drastici a concentrazioni più elevate.

Al fine di sviluppare un metodo che fosse da una parte affidabile e ripetibile e dall'altra parte fosse in grado di consentire la valutazione ulteriore di eventuali farmaci dall'azione protettiva contro lo stress ossidativo, è stata selezionata, per gli studi successivi, una concentrazione sufficiente a provocare effetti evidenti, ma non talmente drastici e irreversibili da vanificare eventuali effetti protettivi ottenibili mediante pre-trattamento con farmaci. A tal fine abbiamo ritenuto soddisfacente il profilo di danno indotto dalla concentrazione di 200  $\mu M$ . Dai dati disponibili in letteratura, il trattamento delle cellule con questa concentrazione, di  $H_2O_2$ , incubato per un periodo di 2 ore si è mostrato in grado di indurre una morte cellulare ampiamente attribuibile a fenomeni apoptotici (Ohori et al. 2008).

Lo studio, in seguito, si è orientato verso la determinazione degli effetti protettivi di  $H_2S$  e a questo scopo è stato utilizzato NaHS, sostanza ampiamente utilizzata in letteratura quale  $H_2S$ -donor di riferimento.





**Grafico 2.** Effetti protettivi concentrazione dipendenti dell'H<sub>2</sub>S esercitati sulle cellule H9c2 esposte ad insulto ossidativo in assenza di riperfusione.

\* Statisticamente differente dal valore di riferimento (veicolo/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µM) (\* = p<0,05; \*\* = p<0,01).

§ Statisticamente differente dal valore di riferimento (MdS) (§§§ = p<0,001).

L'incubazione per un'ora di concentrazioni crescenti dell'H<sub>2</sub>S-donor, in assenza di riperfusione (grafico 2), ha portato ad un effetto protettivo concentrazione-dipendente che raggiunge significatività statistica alla concentrazione di 50 e 100 µM.

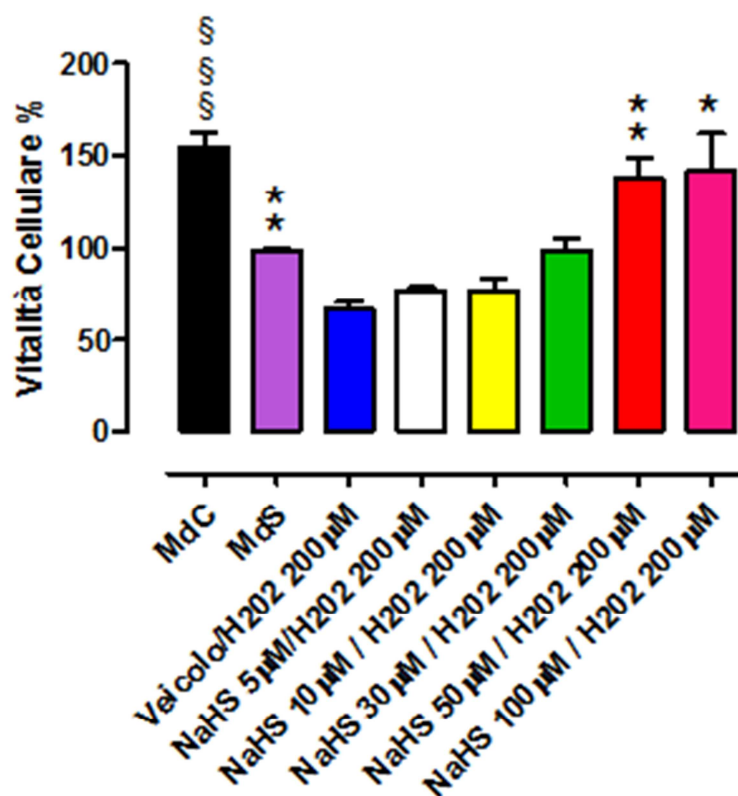
In particolare si può osservare che il pre-trattamento con NaHS già alla concentrazione di 30 µM ha riportato la vitalità cellulare a livelli ottenuti

col mezzo di starvation (100%) e che a concentrazioni più elevate abbiamo addirittura avuto un recupero maggiore, che testimonia come l'attività citoprotettiva dell' $H_2S$  non si espliciti solo nei confronti del danno ossidativo indotto da  $H_2O_2$ , ma anche nei confronti della componente di danno indotta dal mezzo di starvation.

In analogia con quanto osservato nel caso di I/R cardiaca (Testai et al. 2007), un livello moderato di stress ossidativo, quale quello usato nel nostro modello sperimentale, è capace di indurre una diminuzione della vitalità cellulare transitando sia attraverso la via necrotica che quella apoptotica.

Durante la fase di riperfusione, ovvero la fase di ripristino di una normale ossigenazione nei modelli di I/R e la fase di rimozione delle specie reattive nei modelli di stress ossidativo, si verifica un ulteriore, seppur limitato, incremento di fenomeni apoptotici su cui un'efficace strategia farmacologica può risultare particolarmente vantaggiosa.

In questa ottica è stato adoperato un secondo tipo di protocollo sperimentale, costituito da un ciclo di stress ossidativo/riperfusione (SO/R) in cui la valutazione della vitalità cellulare è avvenuta in seguito al periodo di stress ossidativo, seguito da un'ora di incubazione in cui le cellule sono state rifornite col mezzo di coltura completo (high glucose).



**Grafico 3.** Effetto di diverse concentrazioni di NaHS sulla vitalità delle cellule H9c2 trattate con  $H_2O_2$  e successiva riperfusione.

\* Statisticamente differente dal valore di riferimento (veicolo/ $H_2O_2$  200 µM) (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ).

§ Statisticamente differente dal valore di riferimento (MdS) (§§§ =  $p < 0,001$ ).

Nei protocolli di SO/R (grafico 3) si è osservato un pressoché equivalente livello di danno indotto da  $H_2O_2$  ed anche gli effetti protettivi dell' $H_2S$  si sono mantenuti pressoché equivalenti a quanto osservato nel protocollo di solo stress ossidativo non seguito da riperfusione.

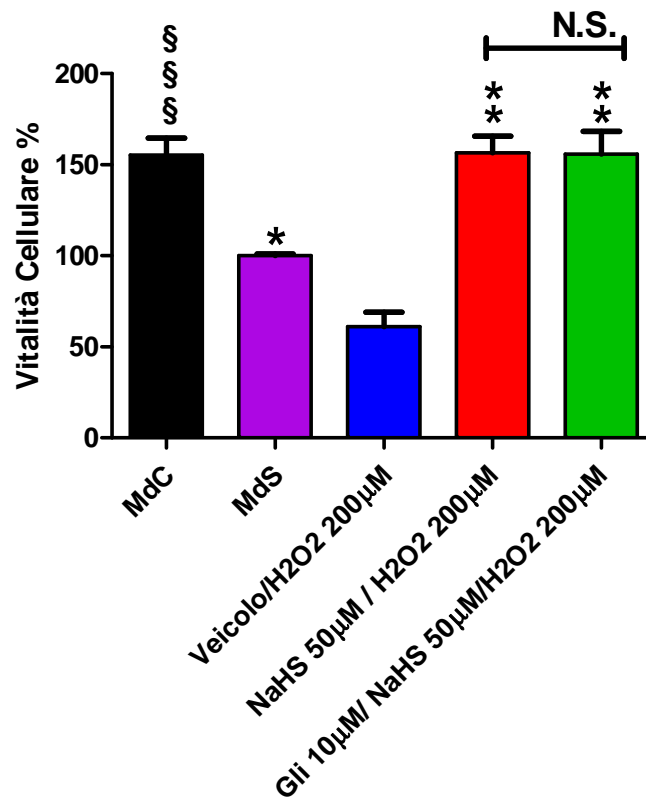
Tale evidenza sperimentale ci porta ad ipotizzare che:

- a) I processi apoptotici nella fase di riperfusione conseguente all'insulto ossidativo siano limitati e non incidano in maniera significativa sui processi di morte cellulare già avvenuti nel processo di stress ossidativo.
- b) L' $H_2S$  sia capace di indurre un meccanismo protettivo che si attiva molto precocemente già nella fase di stress ossidativo.

In ultima analisi, lo studio si è volto al tentativo di compiere un'indagine preliminare al fine di comprendere il meccanismo d'azione dell' $H_2S$ .

Alla luce dei ben noti effetti dell' $H_2S$  sui canali  $K_{ATP}$ , effetti in larga parte responsabili della cardioprotezione promossa da  $H_2S$  in molteplici modelli di insulto miocardico indotto da varie eziologie, il primo obiettivo è stato quello di valutare il coinvolgimento di tale canale ionico negli effetti osservati.

E' stata dunque somministrata glibenclamide, un bloccante non selettivo dei canali  $K_{ATP}$  espressi sia a livello sarcolemmatico che mitocondriale.

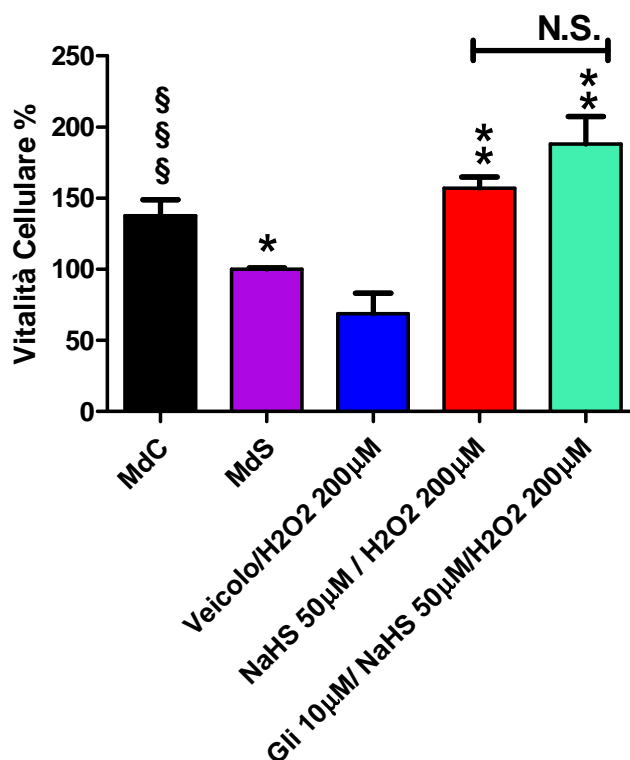


**Grafico 4.** Effetti dell' $H_2S$  sulle cellule H9c2, in presenza o in assenza di (Gli 10 µM) glibenclamide, nel modello di stress ossidativo in assenza di ri-perfusione.

\* Statisticamente differente dal valore di riferimento (veicolo/ $H_2O_2$  200 µM) (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ).

§ Statisticamente differente dal valore di riferimento (MdS) (§§§ =  $p < 0,001$ ).

NS = non significativo rispetto al valore di riferimento (veicolo/ $H_2O_2$  200 µM).



**Grafico 5.** Effetti dell' $H_2S$  sulle cellule H9c2, in assenza e in presenza di glibenclamide (Gli 10 µM), nel modello SO/R.

\* Statisticamente differente dal valore di riferimento (veicolo/ $H_2O_2$  200 µM) (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ).

§ Statisticamente differente dal valore di riferimento (MdS) (§§§ =  $p < 0,001$ ).

NS = non significativo rispetto al valore di riferimento (veicolo/ $H_2O_2$  200 µM)

Nelle nostre condizioni sperimentali quindi, sia in condizioni di stress ossidativo (grafico 4) che in condizioni di SO/R (grafico 5), glibenclamide non ha ridotto significativamente gli effetti protettivi di  $H_2S$ , lasciandoci ipotizzare che questo tipo di canale possa essere estraneo alla risposta di  $H_2S$ .

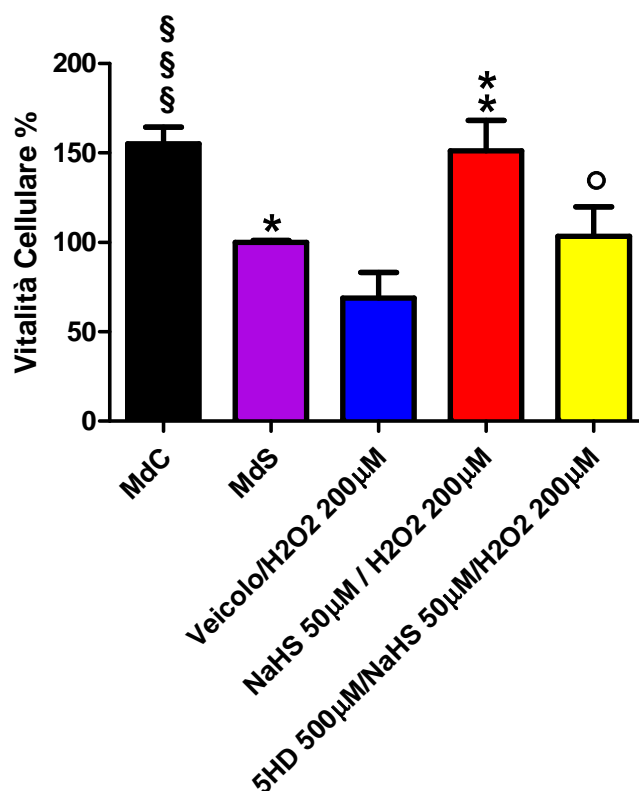
Tuttavia non si può neanche escludere la possibilità che il farmaco glibenclamide, per problemi esclusivamente farmacocinetici, non sia in

grado di raggiungere in modo agevole e quantitativo il target intracellulare rappresentato dai canali mito- $K_{ATP}$ .

Tale ipotesi sembra avvalorata da precedenti dati sperimentali riprodotti nel laboratorio di farmacologia dove è stata realizzata questa tesi, che mostrano come glibenclamide sia in grado di antagonizzare gli effetti di attivatori mito- $K_{ATP}$  in esperimenti condotti su mitocondri isolati, ma sia invece scarsamente capace di inibire tali effetti in modelli sperimentali costituiti da organi isolati o in vivo (dati non pubblicati).

Proprio in quest'ottica abbiamo ritenuto che l'inefficacia della glibenclamide nell'inibire la cardioprotezione esercitata dall' $H_2S$  escluda chiaramente il coinvolgimento di canali sarc- $K_{ATP}$ , ma lasci comunque aperto l'eventuale coinvolgimento dei mito- $K_{ATP}$ .

Siamo passati quindi ad investigare il coinvolgimento del target canale mito- $K_{ATP}$ , mediante l'utilizzo dell'acido 5 idrossi decanoico, bloccante selettivo dei canali mito- $K_{ATP}$  sicuramente in grado di raggiungere il target mitocondriale anche nei modelli cellulari.



**Grafico 6.** Effetto dell' $H_2S$  sulle cellule H9c2 in presenza e in assenza di 5-HD 500 µM, nel modello SO/R.

\* Statisticamente differente dal valore di riferimento (veicolo/ $H_2O_2$  200 µM) (\* =  $p < 0,05$ ;

\*\* =  $p < 0,01$ ).

§ Statisticamente differente dal valore di riferimento (MdS) (§§§ =  $p < 0,001$ ).

○ Statisticamente differente dal valore di riferimento (NaHS 50 µM/  $H_2O_2$  200 µM).

A differenza di quanto osservato con la glibenclamide, il 5-HD nel modello sperimentale di SO/R (grafico 6), ha ridimensionato significativamente gli effetti citoprotettivi di NaHS, suggerendo che l'attività protettiva esplicata da questo  $H_2S$ -donor nelle cellule H9c2 esposte a stress ossidativo, sia probabilmente da imputare, almeno in parte, all'attivazione dei canali mito- $K_{ATP}$ .



## 5. Bibliografia

Abe K and Kimura H. *The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator*. J Neurosci. **1996**;16:1066-1071.

Antoine MH, Berkenboom G, Fang ZY, Fontaine J, Herchulez A, Lebrun P. *Mechanical and ionic response of rat aorta to diazoxide*. Eur J Pharmacol. **1992**;216(2):299-306.

Baczkó I, Jones L, McGuigan CF, Manning Fox JE, Gandhi M, Giles WR, Clanachan AS, Light PE. *Plasma membrane  $K_{ATP}$  channel-mediated cardioprotection involves posthypoxic reductions in calcium overload and contractile dysfunction : mechanistic insights into cardioplegia*. FASEB J. **2005**;19(8):980-2.

Baumgart K, Radermacher P, Wagner F. *Applying gases for microcirculatory and cellular oxygenation in sepsis: Effect of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide*. Curr Opin Anaesthesiol. **2009**;22:168–176.

Bryan J, Vila-Carriles WH, Zhao J, Babenko AP, Aguilar-Bryan L. *Toward linking structure with function in ATP-sensitive  $K_1$  channels*. Diabetes. **2004**;53:S104–S112.

Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM. *Nitric oxide in the central nervous system: Neuroprotection versus neurotoxicity*. Nat Rev Neurosci. **2007**;8: 766–775.

Calderone V, Testai L, Martelli A, Rapposelli S, Digiacomio M, Balsamo A, Breschi MC. *Anti-ischemic properties of a new spiro-cyclic benzopyran activator of the cardiac mito-  $K_{ATP}$  channel*. Biochem Pharmacol. **2010**;79(1): 39-47.

Cavallini D, Modovi B, De Marco C, Sciosciasantoro A. *Inhibitory effect of mercaptoethanol and hypotaurine on the desulfhydration of cysteine by cystathionase*. Arch Biochem Biophys. **1962**;96: 456–457.

Chang L, Geng B, Yu F, Zhao J, Jian H, Du J, Tang C. *Hydrogen sulfide inhibits myocardial injury induced by homocysteine in rats*. Amino acids. **2008**;34:573–585.

Chen AF, Chen DD, Daiber A, Faraci FM, Li H, Rembold CM, Laher I. *Free radical biology of the cardiovascular system*. Clin Sci. **2012**;123:73–91.

Chen S-L, Yang C-T, Yang Z-L, Guo R-X, Meng J-L, Cui Y, Lan A-P, Chen P-X, Feng J-Q. *Hydrogen sulphide protects H9c2 cells against chemical hypoxia-induced cell injuries*. Clin Exp Pharmacol Physiol. **2010**;37(3):316–21.

Chen X, Jhee KH, Kruger WD. *Production of the neuromodulator H<sub>2</sub>S by cystathionine beta-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine*. J Biol Chem. **2004**;279:52082–52086.

Doeller JE, Isbell ST, Benavides G, Koenitzer J, Patel H, Patel RP, Lancaster JR, Darley-Usmar VM, Kraus DW. *Polarographic measurement of hydrogen sulphide production and consumption by mammalian tissues*. Anal Biochem. **2005**; 341:40–51.

Dombkowski RA, Russel MJ, Olson KR. *Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. **2004**;286: R678–R685.

Dominy JE, Stipanuk MH. *New roles for cysteine and transsulfuration enzymes: Production of H<sub>2</sub>S, a neuromodulator and smooth muscle relaxant.* Nutr Rev. **2004**;62:348–353.

Dorman DC, Moulin FJ, McManus BE, Mahle KC, James RA, Struve MF. *Cytochrome oxidase inhibition induced by acute hydrogen sulfide inhalation: Correlation with tissue sulfide concentration in the rat brain, liver, lung, and nasal epithelium.* Toxicol Sci. **2002**;65:18–25.

Eto K, Kimura H. *The production of hydrogen sulfide is regulated by testosterone and S-adenosyl-L-methionine in mouse brain.* J Neurochem. **2002**;83:80–86.

Eto K, Ogasawara M, Umemura K, Nagai Y, Kimura H. *Hydrogen sulfide is produced in response to neuronal excitation.* J Neurosci. **2002**;22:3386–3391.

Fujita A and Kurachi Y. *Molecular Aspects of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel openers.* Pharmacol Ther. **2000**;85(19):39-53.

Furne J, Springfield J, Koenig T, DeMaster E, Levitt MD. *Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: A specialized function of the colonic mucosa.* Biochem Pharmacol. **2001**;62:255–259.

Garlid KD, Dos Santos P, Xie ZJ, Costa AD, Paucek P. *Mitochondrial potassium transport : the role of the mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in cardiac function and cardioprotection.* Biochem Biophys Acta. **2003a**;1606(1-3):1-21.

Garlid KD and Paucek P. *Mitochondrial potassium transport : the K<sup>+</sup> cycle.* Biochim Biophys Acta. **2003b**;1606(1-3):23-41.

Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, Grover GJ. *Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive  $K^+$  channels. Possible mechanism of cardioprotection*, Circ Res. **1997**;81:1072-1082.

Garlid KD . *Opening mitochondrial  $K_{ATP}$  in the heart--what happens, and what does not happen*. Basic Res Cardiol. **2000**;95(4):275-9.

Gaudette GR, Krukenkamp IB, Saltman AE, Horimoto H, Levitsky S. *Preconditioning with PKC and the ATP-sensitive potassium channels : a codependent relationship*. Ann Thorac Surg. **2000** 20(2):602-8.

Geng B, Chang L, Pan C, Qi Y, Zhao J, Pang Y, Du J, Tang C. *Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol*. Biochem Biophys Res Commun. **2004**; 318:756–763.

Geng B, Yang J, Qi Y, Zhao J, Pang Y, Du J, Tang C.  *$H_2S$  generated by heart in rat and its effects on cardiac function*. Biochem Biophys Res Commun. **2004**;313:362–368.

Gouvern M, Andriamihaja M, Nubel T, Blachier F, Bouillaud F. *Sulfide, the first inorganic substrate for human cells*. FASEB J. **2007**;21:1699–1706.

Hausenloy DJ, Wynne A, Duchon M, Yellon D. *Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection*. Circulation. **2004**; 109:1714-1717.

Hearse DJ, Humphrey SM, Chain EB. *Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release*. J Mol Cell Cardiol. **1973**;5(4):395–407.

Hildebrandt TM, Grieshaber MK. *Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria*. FEBS J. **2008**;275:3352–3361.

Holmhamedov EL, Wang L, Terzic A. *ATP-sensitive  $K^+$  channel openers prevent  $Ca^{2+}$  overload in rat cardiac mitochondria*. J Physiol. **1999**;519 Pt 2:347-60.

Holmuhamedov EL, Jovanović A, Terzic A. *Mitochondrial ATP-sensitive  $K^+$  channels modulate cardiac mitochondrial function*. Am J Physiol. **1998**;275(5 Pt 2):H1567-76.

Inagaki N, Gono T, Clement JP, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G. *Reconstitution of  $iK_{ATP}$ : An inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor*. Science. **1995**;270:1166–1170.

Ishii I, Akahoshi N, Yu XN, Kobayashi Y, Namekata K, Komaki G, Kimura H. *Murine cystathionine gamma-lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression*. Biochem J. **2004**;381:113–123.

Jabürek M, Yarov-Yarovoy V, Paucek P, Garlid KD. *State-dependent inhibition of the mitochondrial  $K_{ATP}$  channel by glyburide and 5-hydroxydecanoate*. J Biol Chem. **1998**;273(22):13578-82.

Jiang B, Tang G, Cao K, Wu L, Wang R. *Molecular mechanism for  $H(2)S$ -induced activation of  $K(ATP)$  channels*. Antiox Redox Signal. **2010**;12(10):1167-1178.

Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, Antos CL, Olson EN, Sollot SJ. *Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  mediates convergence of protection signalling to*

*inhibit the mitochondrial permeability transition pore.* J Clin Invest. **2004**;113:1535-1549.

Kamoun P. *Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals.* Amino Acids. **2004**; 26:243–254.

Kasperek MS, Linden DR, Kreis ME, Sarr MG. *Gasotransmitters in the gastrointestinal tract.* Surgery **2007**;143:455-459.

Kimura H. *Hydrogen sulfide : from brain to gut.* Antioxid. Redox Signal. **2010**;12:1111-1123.

Kimura Y, Goto Y, Kimura H. *Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria.* Antiox Redox Signal. **2010**;12:1–13.

Kirsten WJ. *On the ethylene blue reaction and its use for determination of sulphide.* Mikrochimica Acta. **1978**;11:403–409.

Kong X, Tweddell JS, Gross GJ, Baker JE . *Sarcolemmal and mitochondrial  $K_{ATP}$  channels mediate cardioprotection in chronically hypoxic hearts.* J Mol Cell Cardiol. **2001**;33(5):1041-5.

Kuo SM, Lea TC, Stipanuk MH. *Developmental pattern, tissue distribution, and subcellular distribution of cysteine: Alpha-ketoglutarate aminotransferase and 3-mercaptopyruvate sulfur- transferase activities in the rat.* Biol Neonate. **1983**;43:23–32.

Kurzban GP, Chu L, Ebersole JL, Holt SC. *Sulphemoglobin formation in human erythrocytes by cystalysin, an L-cysteine desulfhydrase from Treponema denticola.* Oral Microbiol Immunol. **1999**; 14:153–164.

Lawrence NS, Davis J, Jiang L, Jones TGJ, Davis SN, Compton RG. *Selective determination of thiols: A novel electroanalytical approach.* Analyst. **2000**;125:661–663.

Li L, Hsu A, Moore PK. *Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation-a tale of three gases.* Pharmacol Ther. **2009**;123:386–400.

Liu Y, Gao WD, O'Rourke B, Marban E. *Synergistic modulation of ATP-sensitive  $K^+$  currents by protein kinase C and adenosine. Implications for ischemic preconditioning.* Circ Res. **1996**;78(3):443–54.

Lowicka E, Beltowski J. *Hydrogen sulphide ( $H_2S$ ): The third gas of interest for pharmacologists.* Pharmacol Rep. **2007**;59:4–24.

Mannhold R.  *$K_{ATP}$  channel openers : structure-activity relationships and therapeutic potential.* Med Res Rev. **2004**;24(2):213–66.

Martelli A, Breschi MC, Calderone V. *Pharmacodynamic hybrids coupling established cardiovascular mechanisms of action with additional nitric oxide releasing properties.* Curr Pharm Des. **2009**;15:614–636.

Martelli A, Rapposelli S, Calderone V. *NO-releasing hybrids of cardiovascular drugs.* Curr Med Chem. **2006**;13:609–625.

Matsuo M, Kimura Y, Ueda K.  *$K_{ATP}$  channel interaction with adenine nucleotides.* J Mol Cell Cardiol. **2005**;38:907–916.

Miki T, Seino S. *Roles of  $K_{ATP}$  channels as metabolic sensors in acute metabolic changes.* J Mol Cell Cardiol. **2005**;38:917–925.

Mishra PK, Tyagi N, Sen U, Givvimani S, Tyagi SC.  *$H_2S$  ameliorates oxidative and proteolytic stresses and protects the heart against adverse*

*remodelling in chronic heart failure.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. **2010**;298:H451–H456.

Mitsuhashi H, Yamashita S, Ikeuchi H, Kuroiwa T, Kaneko Y, Hiromura K, Ueki K, Nojima Y. *Oxidative stress-dependent conversion of hydrogen sulfide to sulfite by activated neutrophils.* Shock. **2005**;24:529–534.

Moore PK, Bhatia M, Mochala S. *Hydrogen sulphide: From the smell of the past to the mediator of the future?* Trends Pharmacol Sci. **2003**;24:609–611.

Mubagwa K and Flameng W. *Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview.* Cardiovasc Res. **2001**;52(1):25-39.

Nicholls P, Kim, JK. *Sulphide as an inhibitor and electron donor for the cytochrome c oxidase system.* Can J Biochem. **1982**;60:613–623.

Nichols CG. *K<sub>ATP</sub> channels as molecular sensors of cellular metabolism.* Nature. **2006**;440: 470–476.

Noma A. *ATP-regulated K<sup>+</sup> channel in cardiac muscle.* Nature. **1983**;305(5930):147-8.

Nozawa Y, Miura T, Ohnuma Y, Yano T, Shimamoto K. *Mitochondrial K<sub>ATP</sub> channel-dependent and -independent phases of ischemic preconditioning against myocardial infarction in the rat.* Basic Res Cardiol. **2003**;98:50-58.

O'Rourke F, Soons K, Flaumenhaft AR, Watras J, Baio-Larue C, Matthews E, Feinstein MB. *Ca<sup>2+</sup> release by inositol 1,4,5-triphosphate is blocked by the K<sup>+</sup> channel blockers apamin and tetrapentylammonium ion, and a monoclonal antibody to a 63 kDa membrane protein : reversal*



*of blockade by K<sup>+</sup> ionophores nigericin and valinomycin and purification of the 63 kDa antibody-binding protein.* Biochem J. **1994**;300:673-683.

Ockaili R, Emani VR, Okubo S, Brown M, Krottapalli K, Kukreja RC. *Opening of mitochondrial K<sub>ATP</sub> channel induces early and delayed cardioprotective effect : role of nitric oxide.* AM J Physiol. **1999**;227(6 Pt 2):H2425-34.

Ohnuma Y, Miura T, Miki T, Tanno M, Kuno A, Tsuchida A, Shimamoto K. *Opening of mitochondrial K<sub>ATP</sub> channel occurs downstream of PKC-epsilon activation in the mechanism of preconditioning .* Am. J. Physiol Heart Circ Physiol. **2002**;283:H440-7.

Ohori K, Miura T, Tanno M, Miki T, Sato T, Ishikawa S, Horio Y, Shimamoto K. *Ser9 phosphorylation of mitochondrial GSK-3β is a primary mechanism of cardiomyocyte protection by erythropoietin against oxidant-induced apoptosis.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. **2008**;295:H2079-H2086.

Olson KR, Donald JA. *Nervous control of circulation-the role of gasotransmitters, NO, CO and H<sub>2</sub>S.* Acta Histochem. **2009**;111:244-256.

Olson KR. *Is hydrogen sulfide a circulating “gasotransmitter” in vertebrate blood?* Biochem Biophys Acta. **2009**;1787:856-863.

Peterson LR, Garvey RH, Green AES. *Energy deposition in a gaseous mixture.* Journal of geophysical Research. **1978**;83:5315-5317.

Pirotte B, De Tullio P, Lebrun P, Antoine MH, Fontaine J, Masereel B, Schynts M, Dupont L, Herchuletz A, Delarge J. *3-(Alkylamino)-4H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxes as powerful inhibitors of insulin release from rat pancreatic B-cells: a new class of potassium channel openers?* J Med Chem. **1993**;36(21):3221-3.

Ponderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobo N, Schopfer F, Boveris A. *Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles*. Arch Biochem Biophys. **1996**;328:85–92.

Porter P, Grishaver MS, Jones OW. *Characterization of human cystathionine beta-synthase: Evidence for the identity of human L-serine dehydratase and cystathionine beta-synthase*. Biochim Biophys Acta. **1974**;364:128–139.

Prockop LD, Chichkova RI. Carbon monoxide intoxication: An updated review. J Neurol Sci. **2007**;262:122–130.

Pun PB, Lu J, Kan EM, Moolchhala S. *Gases in the mitochondria*. Mitochondrion. **2010**;10:83–93.

Raedschelders K, Ansley DM, Chen DY. *The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion*. Pharmacol Ther. **2012**; 133: 230-255.

Rakhit RD, Edwards RJ, Maber MS. *Nitric oxide nitrates and ischemic preconditioning*. Cardiovasc Res. **1999**;43(3):621-7.

Robert K, Vialard F, Thiery E, Toyama K, Sinet PM, Janel N, London J. *Expression of the cystathionine beta synthase (CBS) gene during mouse development and immunolocalization in adult brain*. J Histochem Cytochem. **2003**;51:363–371.

Rodrigo GC, Davies NW, Standen NB. *Diazoxide causes early activation of cardiac sarcolemmal  $K_{ATP}$  channels during metabolic inhibition by an indirect mechanism*. Cardiovasc Res. **2004**;61(3):570-9.

Rostovtseva T and Colombini M. *VDAC channels mediate and gate the flow of ATP : implications for the regulation of mitochondrial function* . Biophys J. **1997**;72(5):1954-62.

Sanada S, Kitakaze M, Asanuma H, Harada K, Ogita H, Node K, Takashima S, Sakata Y, Asakura M, Shinozaki Y, Mori H, Kuzuya T, Hori M. *Role of mitochondrial and sarcolemmal  $K_{ATP}$  channels in ischemic preconditioning of the canine heart*. Am Physiol Heart Circ Physiol. **2001**;280:H256-H263.

Sarkela TM, Berthiaume J, Elfering S, Gybina AA, Giulivi C. *The modulation of oxygen radical production by nitric oxide in mitochondria*. J Biol Chem. **2001**;276:6945–6949.

Sato T, Sasaki N, Seharaseyon J, O'Rourke B, Marbán E. *Selective pharmacological agents implicate mitochondrial but not sarcolemmal  $K_{ATP}$  channels in ischemic cardioprotection*. Circulation. **2002**;101(20):2418-23.

Schlattner U, Dolder M, Wallimann T, Tokarska-Schlattner M. *Mitochondrial creatine kinase and mitochondrial outer membrane porin show a direct interaction that is modulated by calcium*. J Biol Chem. **2001**;276(51):48027-30.

Searcy DG, Lee SH. *Sulfur reduction by human erythrocytes*. J Exp Zool. **1998**;282:310–322.

Seary DG, Peterson MA. *Hydrogen sulphide consumption measured at low steady state concentration using a sulfidostat*. Anal Biochem. **2004**;324:269–275.

Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y, Nagahara N, Kimura H. *Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide*. J Biochem. **2009**;146:623–626.

Shultz R, Rose J, Heusch G. *Involvement of activation of ATP-dependent potassium channels in ischemic preconditioning in swine*. Am J Physiol. **1994**;267(4 Pt 2):H1341-52.

Stipanuk MH, Beck PW. *Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat*. Biochem J. **1982**;206:267–277.

Szabo C. *Hydrogen sulphide and its therapeutic potential*. Nat Rev Drug Discov. **2007**;6:917-935.

Szewczyk A. *The ATP-regulated  $K^+$  channel in mitochondria : five years after its discovery*. Acta Biochim Pol. **1996**;43(4):713-9.

Taoka S, Banerjee R. *Characterization of NO binding to human cystathionine beta-synthase: Possible implications of the effects of CO and NO binding to the human enzyme*. J Inorg Biochem. **2001**;87:245–251.

Telezhkin V, Brazier SP, Cayzac S, Muller CT, Riccardi D, Kemp PJ. *Hydrogen sulfide inhibits human BK(Ca) channels*. Adv Exp Med Biol. **2009**;648:65–72.

Testai L, Rapposelli S, Calderone V, *Cardiac ATP-sensitive Potassium Channels : A Potenzial target for Anti-Ischemic Pharmacological Strategy*. Cardiovascular and Hematological Agent in Medicinal Chemistry **2007**;5:79-90.

Theissen U, Martin W. *Sulfide-quinone oxidoreductase (SQR) from the lugworm *Areicola marina* shows cyanide- and thioredoxin-dependent activity*. FEBS J. **2008**;275:1131–1139.

Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Schumacker PT. *Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes*. J Biol Chem. **1998**;273(29):18092-8.

Volkel S, Grieshaber MK. *Mitochondrial sulphide oxidation in *Arenicola marina*. Evidence for alternative electron pathways*. Eur J Biochem. **1996**;235:231–237.

Wang R. *The gasotransmitter role of hydrogen sulfide*. Antioxid Redox Signal. **2003**;5:493–501.

Wang R. *Two's company, three's crowd: Can  $H_2S$  be the third endogenous gaseous transmitter?* FASEB J. **2002**;16:1792–1798.

Waring M, Drappats J, Weichel O, Seimetz P, Sarri E, Böckmann J, Kempter U, Valeva A, Klein J. *Modulation of neuronal phospholipase D activity under depolarizing conditions*. FEBS Lett. **1999**;464(1-2):21-4.

Wei T, Chen C, Hou J, Xin W, Mori A. *Nitric oxide induces oxidative stress and apoptosis in neuronal cells*. Biochim Biophys Acta. **2000**;1498:72–79.

Whiteman M, Armstrong JS, Chu SH, Siau J-L, Cheung NS, Halliwell B, Moore PK. *The novel neuromodulator hydrogen sulfide: An endogenous peroxynitrite “scavenger”?* J Neurochem. **2004**;90:765–768.

Whiteman M, Cheung NS, Zhu YZ, Chu SH, Siau J-L, Wong BS, Armstrong JS, Moore PK. *Hydrogen sulphide: A novel inhibitor of*

*hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain?* Biochem Biophys Res Commun. **2005**;326:794–798.

Xu M, Wang Y, Ayub A, Ashraf M. *Mitochondrial  $K_{ATP}$  channel activation reduces anoxic injury by restoring mitochondrial membrane potential.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. **2001**;281:H1295-H1303.

Yamanishi T, Tuboi S. *The mechanism of the L-cystine cleavage reaction catalyzed by rat liver gamma-cystathionase.* J Biochem **1981**;8:1913–1921.

Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa AK, Mu W, Zhang S, Snyder SH, Wang R.  *$H_2S$  as a physiologic vasorelaxant: Hypertension in mice with deletion of cystathionin gamma-lyase.* Science. **2008**;322:587–590.

Yao Z and Gross GJ. *Effects of the  $K_{ATP}$  channel opener bimakalim on coronary blood flow, monophasic action potential duration, and infarct size in dogs.* Circulation. **1994**;89(4):1769-75.

Zhao W, Ndisang JF, Wang R. *Modulation of endogenous production of  $H_2S$  in rat tissues.* Can J Physiol Pharmacol. **2003**;81:848–853.

Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. *The vasorelaxant effect of  $H_2S$  as a novel endogenous gaseous  $K(ATP)$  channel opener.* EMBO J. **2001**;20:6008–6016.

Zhao Z, Malinowski ER. *Window factor analysis of methylene blue in water.* J Chemometr. **1999**;13:83–94.

Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML. *Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium.* Proc Natl Acad Sci U S A. **1987**;84(5):1404–1407.

